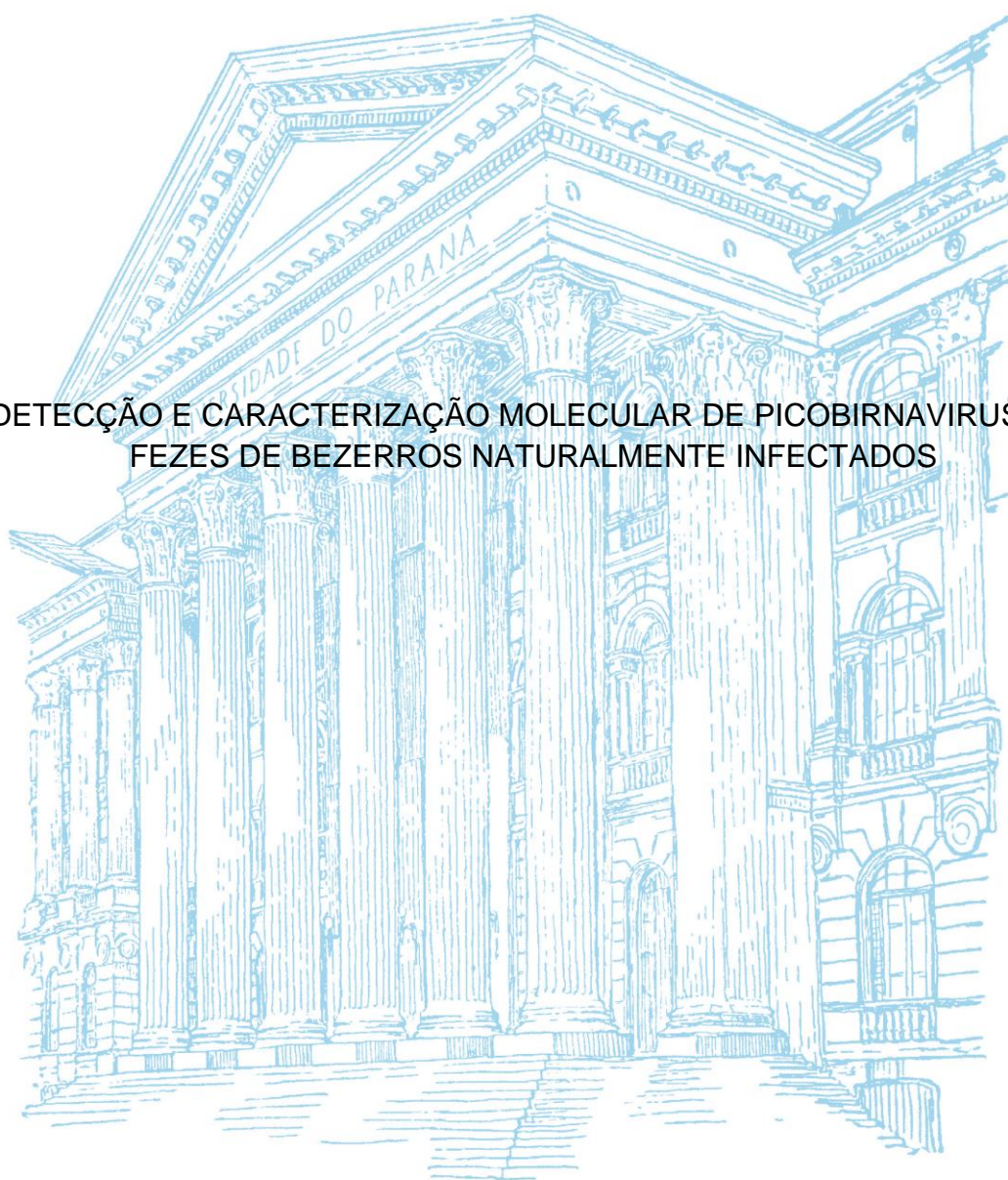


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

RÚBIA MACEDO

DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE PICOBIRNAVIRUS EM
FEZES DE BEZERROS NATURALMENTE INFECTADOS



PALOTINA

2014

RÚBIA MACEDO

DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE PICOBIRNAVIRUS EM
FEZES DE BEZERROS NATURALMENTE INFECTADOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração em Saúde Animal, linha de pesquisa em Microbiologia Aplicada à Produção, Setor Palotina, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Elisabete Takiuchi

PALOTINA

2014

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL



TERMO DE APROVAÇÃO

RUBIA MACEDO

**“DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE PICOBIRNAVIRUS EM
FEZES DE BEZERROS NATURALMENTE INFECTADOS”**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal, Área de Concentração em Saúde Animal, Setor Palotina, Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:

Professora. Dra. Elisabete Takiuchi

Presidente/Orientador: Universidade Federal do Paraná

Professor. Dr. Marco Antônio Bacellar Barreiros

Membro: Universidade Federal do Paraná

Professora Dra. Edna Tereza de Lima

Membro: Universidade Federal do Paraná

Palotina, 17 de outubro de 2014

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Rúbia Macedo, filha de Marcos Ciebre de Macedo e Mafalda Luiza de Macedo. Natural de Braganey-Pr, nascida em 06/03/1988. Formada em Medicina Veterinária pela Universidade Federal do Paraná. Mestranda do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina na área de Microbiologia aplicada à Produção Animal.

AGRADECIMENTOS

Agradeço...

A Deus pela minha vida, por ter me presenteado com uma família tão maravilhosa e ter me proporcionado várias conquistas até hoje.

Aos meus pais que me apoiaram desde o primeiro momento em que decidi qual a profissão queria seguir. Juntos lutaram muito para que esse sonho se tornasse realidade. Em especial a minha mãe que nunca me deixou desamparada, deu seu amor, carinho e atenção.

Ao meu irmão Lucas, que apoiou a minha decisão e, sempre que precisei, estava lá para ajudar.

À minha irmã Andrea, pelo apoio e por ter trazido nosso anjo da guarda, Gabriel, para alegrar nossos dias.

Ao meu amigo e namorado, Paulo Henrique, por toda caminhada que fizemos juntos até o dia de hoje e pelas próximas que virão, pela paciência e pela compreensão, por me aturar, me ajudar e me fazer feliz, pelas broncas e dias passados sem namorar.

Aos colegas e amigos de laboratório (LABIOTEC), Andressa, Jéssica e Janaína, obrigado pela companhia e pelo auxílio em diversas ocasiões. Em especial à Jéssica, por ter passado todo o seu conhecimento de técnicas de laboratório e por estar presente em todos os momentos de elaboração deste trabalho.

Às minhas amigas da graduação Raquel, Valéria, que apesar da distância ainda me proporcionam muitos momentos de alegria.

Aos colegas do Laboratório de Virologia da Universidade Estadual de Londrina, pela receptividade e gentileza com que me receberam; em especial ao Professor Dr. Amauri Alfieri por ter aberto as portas de seu laboratório para realizar as análises, e ao Rodrigo Alejandro Otonel por ter me acompanhado e auxiliado.

Aos colegas de pós-graduação, especialmente ao meu irmão científico André, que sempre esteve ouvindo meus choros e lamentações.

Aos professores Dra. Edna Tereza de Lima e Dr. Marco Antonio Bacellar Barreiros, por terem aceitado o convite para participar da banca e pelas valiosas contribuições.

À professora Dra. Elisabete Takiuchi, pela orientação no mestrado, além de me ensinar a teoria, sempre que necessário me deu dicas construtivas e teve a

paciência de me orientar, sempre acolhedora e motivadora. Com ela aprendi muito mais do que ciência e virologia, um espelho de profissional e pessoa.

Aos colegas do Colégio Agrícola de Palotina pelo apoio, e principalmente à direção por entender minhas ausências. E a todos os colegas do “grupo” pela amizade, em especial a Ivanete, Elis, Marcelo, Davi e Greyce pelas horas de descontração.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, pela formação acadêmica.

A todos vocês que de longe ou de perto, de uma forma ou de outra, ajudaram a realizar este sonho, o meu muito obrigada.

“Não tenha medo de ir além dos seus sonhos ou do que você quer ser, mas esteja disposto a pagar o preço.”

(Lane Frost)

MACEDO, R. **Detecção e caracterização molecular de *Picobirnavirus* em fezes de bovinos naturalmente infectados**. 64f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal; Área de Concentração: Saúde Animal; Linha de Pesquisa: Microbiologia aplicada à produção animal) – Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, Palotina. 2014.

RESUMO

Picobirnavírus (PBV) pertencem à família *Picobirnaviridae*, tendo como espécies tipo o *Human picobirnavirus* e *Rabbit picobirnavirus*. São pequenos vírus não envelopados, cujo genoma é constituído por dois segmentos genômicos de RNA dupla fita. A patogenia e os mecanismos da infecção por PBV e sua associação a gastroenterites ainda não estão elucidados, atualmente são tidos como agentes emergentes e oportunistas e seu potencial zoonótico foi sugerido. As técnicas utilizadas para a identificação desses vírus são: eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) e RT-PCR. A primeira permite diferenciar os PBV pelas diferenças de migração dos seus segmentos genômicos. Já na RT-PCR permitem sua diferenciação em genogrupo I ou II. Este estudo objetivou a detecção e a caracterização molecular de PBV em bovinos naturalmente infectados. Foram analisadas 289 amostras de fezes de bezerros com idade inferior a 60 dias de idade para a presença de PBV utilizando a técnica EGPA, após realizou a confirmação por RT-PCR para genogrupo I e sequenciamento. Foi detectada uma incidência de 8,3% (24/284) de PBV pela técnica EGPA, sendo que o perfil curto de migração foi o mais detectado (79,2%), o perfil longo foi encontrado em 20,8% das amostras, sendo o primeiro deste eletroferótipo descrito em bovinos. Das amostras positivas para PBV identificadas, 75% (18/24) eram representativas de animais com quadro clínico de diarreia, além de sete amostras (29,17%) apresentaram co-infecção por oocistos de *Cryptosporidium* spp. Pela técnica de RT-PCR, 15 amostras (62,5%) resultaram em amplificadas de 201 pares de bases (bp), referente ao gene RdRp (segmento 2) e realizou-se o sequenciamento da primeira amostra de PBV bovino brasileira. A análise da matriz de identidade de nucleotídeos demonstrou que a amostra Bovine PBV18, denominada neste estudo, apresentou maior identidade (81%) com PBV detectado em peru (MD-2010/HM803965) e menor identidade (62,3%) com o protótipo PBV bovino RUBV-P detectado na Índia. Este trabalho apresenta a primeira obtenção de sequências de nucleotídeos de PBV de bovinos no continente americano e a primeira detecção de PBV perfil longo em bovinos.

Palavras chaves: Picobirnavírus, Bovino, EGPA, RT-PCR

MACEDO, R. **Detection and molecular characterization of Picobirnavirus in feces of naturally infected cattle.** 64f. Thesis (MS in Animal Science; Area of Concentration: Animal Health, Research Interests: Microbiology applied to animal production) – Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, Palotina. 2014.

ABSTRACT

Picobirnavirus (PBV) belongs to the *Picobirnaviridae* family, with *Human picobirnavirus* and *Rabbit picobirnavirus* as the type species. PBV are small non-enveloped viruses, whose genomes comprise two genomic segments of double-stranded RNA. The pathogenesis and infection mechanisms PBV and its association with gastroenteritis have not been elucidated. Currently, are considered emerging and opportunistic agents and their zoonotic potential was suggested. The techniques used for the identification of these viruses are: polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and RT-PCR. The first technique allows differentiating PBV by differences in migration of its genome segments. The RT-PCR allows their differentiation into genogroup I or II. This study aimed to detection and molecular characterization of PBV in naturally infected cattle. Two hundred eighty-nine (289) stool samples from calves under 60 days old were analyzed, looking for the presence of PBV using the PAGE technique. After this, the confirmation by RT-PCR for genogroup I and sequencing was performed. An incidence of 8.3% (24/284) of PBV was detected by PAGE technique, wherein the short migration profile was more detected (79.2%). The long profile was found in 20.8% of samples, being the first one electropherotyping was described in cattle, of which 75% (18/24) were representative of animals with clinical diarrhea. In addition, seven samples (29.17%) had co-infection with *Cryptosporidium* spp. By RT-PCR technique, 15 samples (62.5%) resulted in amplified 201 base pairs (bp), for the RdRp gene (segment 2) and carried out the sequencing of the first sample of Brazilian bovine PBV. The analysis of nucleotide identity matrix showed that the sample Bovine PBV18, named in this study, had higher identity (81%) with PBV detected in turkey (MD-2010 / HM803965) and less identity (62.3%) with the prototype bovine RUBV PBV-P detected in India. This work presents the first obtaining nucleotide sequencing of bovine PBV in the Americas and the first detection of long profile PBV in cattle.

Key words: Picobirnavirus, bovine, PAGE, RT-PCR

LISTA DE ABREVIATURAS

cDNA	- DNA complementar
dNTP	- Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
dsRNA	- <i>Double stranded RNA</i>
EDTA	- Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGPA	- Eletroforese em gel de poliacrilamida
GI	- Genogrupo I
GII	- Genogrupo II
HIV	- Vírus da imunodeficiência humana
ICTV	- <i>International Committee of Taxonomy of Virus</i>
M-MLV	- <i>Moloney Murine Leukemia Virus</i>
nm	- Nanômetro
NSP1	- <i>Non structural protein</i>
ORF	- <i>Open reading frame</i>
pb	- Pares de bases
PBV	- Picobirnavirus
PCR	- <i>Polymerase chain reaction</i>
pH	- Potencial de hidrogénio
RdRp	- <i>RNA-dependent RNA polymerase</i>
RNA	- <i>Ribonucleic acid</i>
rpm	- Rotação por minuto
RT	- <i>Reverse transcription</i>
SDS	- Sódio dodecil sulfato
TBE	- Tris, ácido Bórico e ácido etilenodiamino tetra-acético.
TERV	- Tampão de estabilização de rotavírus
µg	- Micrograma
µL	- Microlitro
UV	- Radiação ultravioleta
VLPs	- <i>Virion-like particle</i>
VP	- <i>Viral protein</i>

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Estudos de detecção de PBV em fezes coletadas de diversas espécies de animais de acordo com a localidade e método diagnóstico.....	18
Tabela 2:	Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores para a caracterização de genogrupos de PBV por RT-PCR, desenhados a partir de vírus identificados em fezes de humanos (ROSEN et al., 2000)	23
Tabela 3:	Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores para amplificação genômica parcial do segmento 2 do PBV genogrupo I por RT-PCR.....	27

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Organização estrutural de Picobirnavirus baseado na sequência protótipo de PBV humano Hy00510216
- Figura 2: Eletroforese em gel de poliacrilamida seguida pela coloração por nitrato de prata de dsRNA de picobirnavirus (PBV) e rotavírus A (RVA) extraídos de amostras fecais de bezerros. Linhas 1,4 e 5: padrão de migração (4-2-3-2) de dsRNA de RVA; Linha 2: perfil eletroforético longo de PBV; Canaleta 7: perfil eletroforético curto de PBV; Linhas 3, 6 e 8: amostras negativas.32
- Figura 3: Oocistos de *Cryptosporidium spp* corados pela técnica de Ziehl Nielsen em amostra de fezes de bezerro positiva para Picobirnavírus34
- Figura 4: RT-PCR de PBV bovino a partir de amostras fecais de bezerros previamente triadas pela EGPA. Linha 1: Padrão de tamanho molecular (1kb); linhas 2,3,4,7,6,8 e 9: produto amplificado de 201 bp utilizando o par de *primers* específico para PBV genogrupo I (PicoB25 e Pico B43); linhas: , linha 10: PBV bovino não amplificadas.36
- Figura 5: Relação filogenética entre variantes genômicas de PBV do genogrupo I baseada em 199 nucleotídeos do gene RdRp (segmento 2). A sequência obtida neste estudo está indicada pelo símbolo ●. A árvore filogenética foi inferida pelo programa *MEGA6* utilizando o método de *Neighbor-Joining*, com as distâncias evolutivas calculadas pelo método Kimura 2 parâmetros. Valores de *bootstrap* são indicados próximos aos nós. As barras representam unidades de substituição por nucleotídeo.37

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	13
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1	Características gerais do Picobirnavírus	15
2.2	Epidemiologia.....	17
2.3	Patogenia	21
2.4	Diagnóstico laboratorial.....	22
2.5	Picobirnavírus bovino	24
3	OBJETIVOS.....	25
3.1	Objetivo geral	25
3.2	Objetivos específicos	25
4	MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1	Amostras de fezes.....	26
4.2	Extração bruta de fezes	26
4.3	Extração de ácido nucléico viral	26
4.4	Eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA)	27
4.5	RT-PCR para detecção de Picobirnavirus.....	27
4.6	Análise dos produtos da RT-PCR	28
4.7	Sequenciamento e análise filogenética	28
4.8	Pesquisa de oocistos de <i>Cryptosporidium spp.</i>	29
4.9	Análise estatística	30
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.1	Detecção de Picobirnavírus em EGPA.....	30
5.2	Co-infecção PBV/ <i>Cryptosporidium spp</i>	34
5.3	RT-PCR e sequenciamento de PBV	35
6	CONCLUSÕES.....	40
7	REFERÊNCIAS	42

1 INTRODUÇÃO GERAL

Os Picobirnavírus (PBV) constituem um grupo de vírus não envelopados os quais foram recentemente classificados e agrupados pelo ICTV (*International Committee of Taxonomy of Virus*) na família *Picobirnaviridae* e num único gênero, o *Picobirnavirus*. A nomenclatura dos PBV faz referência ao diminuto tamanho (pico) e genoma RNA de fita dupla bissegmentado (birna) destes vírus (GANESH et al., 2010). A classificação desses vírus emergiu após os achados ocasionais de dois segmentos genômicos obtidos do extraído de amostras fecais de crianças, que havia sido originalmente analisado quanto à presença do rotavírus pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida seguida pela coloração por nitrato de prata (EGPA) (PEREIRA et al., 1988a).

A alta variabilidade genética dos PBV tem sido demonstrada pela diferença de migração dos segmentos genômicos em EGPA (perfil eletroforético longo e curto) e confirmada através de estudos moleculares comparativos de sequências genômicas do PBV de diferentes hospedeiros. A comparação de sequências de nucleotídeos e de aminoácidos de uma curta sequência do segmento 2 (gene RdRp) do PBV norteia a proposta atual de classificação dos PBV em genogrupo I e II.

Os mecanismos da infecção por PBV e sua associação a gastroenterites ainda não estão esclarecidos, embora em humanos haja indícios de que estes vírus atuem como agentes emergentes e oportunistas e inclusive com potencial zoonótico (GIORDANO et al., 2008. GANESH et al., 2010). Em bovinos, existe apenas um relato de detecção do PBV no Brasil, porém nenhum estudo de caracterização molecular foi realizado até o momento (BUZINARO et al., 2003).

Entre as técnicas laboratoriais mundialmente utilizadas para a detecção e a identificação do PBV estão a EGPA, considerada a técnica ouro no diagnóstico de PBV, e a transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR). A primeira permite diferenciar os PBV pelas diferenças de migração dos segmentos genômicos (perfil longo e curto) e a RT-PCR permite a diferenciação dos PBV em genogrupos I e II (NATES, GATTI e LUDERT, 2011)

Devido às controvérsias sobre a participação do PBV nos quadros de diarreia e à escassez de informações deste vírus em populações bovinas, tornam-se

necessários novos estudos que possam elucidar as hipóteses inconclusivas na epidemiologia do PBV.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Características gerais do Picobirnavírus

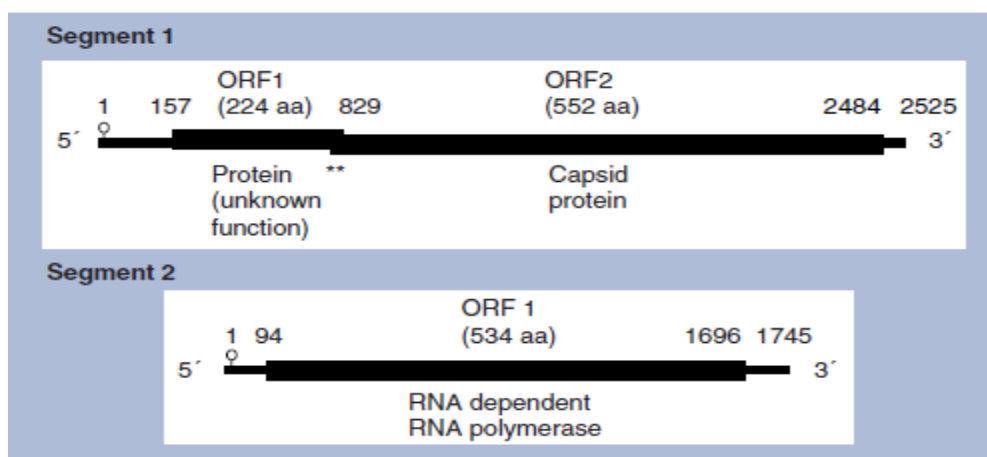
Picobirnavirus (PBV) é o único gênero pertencente à família *Picobirnaviridae*, tendo duas espécies classificadas pelo Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus (ICTV): *Human picobirnavirus* e *Rabbit picobirnavirus*. A nomenclatura dos picobirnavírus está diretamente relacionada às características estruturais do vírus. O prefixo “pico” refere-se ao diminuto tamanho do virion (35 a 40 nm de diâmetro) e “birna” representa o genoma viral constituído por dois segmentos de RNA de fita dupla (dsRNA). (NATES, GATTI e LUDERT, 2011; ICTV, 2013).

O PBV, detectado em fezes de animais e humanos, é um vírus não envelopado, essencialmente constituído por um capsídeo de simetria icosaédrica que protege os dois segmentos do dsRNA genômico, denominados Segmento 1 (ou segmento maior) e Segmento 2 (ou segmento menor), (MONDAL, et al., 2014). O tamanho dos segmentos genômicos de PBV tem sido estimado utilizando como referência o perfil de migração eletroforética do genoma de estirpes de rotavírus padrão em eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) (PEREIRA et al., 1988a; LUDERT et al., 1991).

A organização do genoma desse vírus é baseada na amostra de PBV humano (Hy0050102), originária da Tailândia. Esta era a única sequência de genoma de PBV completo conhecida até 2012 quando então Woo et al. (2012) relataram o genoma completo de PBV detectado em fezes de um leão marinho. Particularmente, na amostra humana Hy005012, o Segmento 1 e o Segmento 2 possuem tamanhos de 2525 e 1745 pares de bases, respectivamente. O Segmento 1 possui duas fases de leitura (ORF1 e ORF2) responsáveis pela expressão de uma proteína de função ainda desconhecida e a proteína do capsídeo, respectivamente. O Segmento 2 possui uma única fase de leitura (ORF1) que codifica um peptídeo de 534 aminoácidos, uma RNA polimerase viral dependente de RNA (RdRp), conforme demonstrado na Figura 1 (NATES, GATTI e LUDERT, 2011). Com base na variabilidade genética do Segmento 2, os PBVs tem sido classificados em dois genogrupos: genogrupo I (GI) e genogrupo II (GII). A maioria das amostras descritas

pertence ao GI do PBV e infecta uma ampla variedade de espécies hospedeiras (BHATTACHARYA et al., 2007).

Figura 1: Organização estrutural de Picobirnavirus baseado na sequência protótipo de PBV humano



A identidade entre GI e GII é de aproximadamente 37 a 40% para nucleotídeos e 17 a 28% para a sequência deduzida de aminoácidos. A frequência de circulação dos genogrupos tem sido bastante desigual, com a maioria das amostras detectadas nas fezes pertencendo ao GI. Entretanto, a relevância biológica ou clínica relacionada aos dois genogrupos é desconhecida. Dentro de um mesmo genogrupo a identidade de nucleotídeos e de aminoácidos pode variar de 60 a 87% e 64 a 90%, respectivamente, reiterando a alta variabilidade dos PBVs circulantes (ROSEN et al., 2000; BÁNYAI et al., 2003; MARTINEZ et al., 2003; BHATTACHARYA et al., 2006; BHATTACHARYA et al., 2007; SYMONDS et al., 2009; GANESH et al., 2010; VAN LEEUWEN et al., 2010).

São descritos vários estudos de detecção e/ou caracterização molecular de PBV detectados em diversas espécies de mamíferos: ratos (PEREIRA et al., 1988b; FREGOLENTE et al., 2009), bovinos (VANOPDENBOSCH & WELLEMANS, 1989; BUZINARO et al., 2003; GHOSH et al., 2009; MALIK et al., 2011), suínos (GATTI et al., 1989; LUDERT et al., 1991; PONGSUWANNA et al., 1996; BÁNYAI et al., 2008; CARRUYO et al., 2008), cavalos (BROWNING et al., 1991), coelhos (GALLIMORE et al., 1993; LUDERT et al., 1995), tamanduá bandeira (HAGA et al., 1999), cães (COSTA et al., 2004; FREGOLENTE et al., 2009), macacos (WANG et al., 2012) jumento, orangotango e tatu (MASACHESSI et al., 2007). Em aves, foram detectados PBV em galinhas (LEITE et al., 1990; SILVA et al., 2013), gansos

(MASACHESSI et al., 2007), ema, pelicano e faisão (MASACHESSI et al., 2007) e, em répteis, esses vírus foram encontrados em diferentes espécies de cobra (FREGOLENTE et al., 2009). Na espécie bovina, estão disponíveis em bases públicas de dados sequências parciais do genoma de PBV procedentes apenas do continente asiático, especificamente Índia e Japão.

Assim como ocorre com outros vírus de genoma dsRNA, tais como rotavírus e birnavírus, as bandas que constituem os segmentos genômicos do PBV podem apresentar perfis de mobilidade eletroforética distintos (longo ou curto) em diferentes amostras submetidas à EGPA. No PBV de perfil curto, o maior segmento possui 1,75 kpb e o menor 1,55 kpb. No perfil longo, os tamanhos estimados dos segmentos maior e menor dos PBV são de 2,3 a 2,6 kpb e de 1,5 a 1,9 kpb, respectivamente (GATTI et al., 1989).

2.2 Epidemiologia

A primeira descrição do PBV foi realizada por Pereira et al. (1988a), que evidenciaram a presença de dois segmentos genômicos em amostras fecais de crianças analisadas pela técnica de EGPA. A partir deste relato, estudos em diversos países confirmaram a presença do PBV em fezes humanas, bem como em amostras fecais de diferentes espécies animais, incluindo mamíferos, aves e répteis (NATES, GATTI e LUDERT, 2011). A Tabela 1 sumariza os estudos nas diferentes espécies animais em que o PBV foi detectado.

As frequências de PBV encontradas nos estudos variam amplamente, sendo principalmente influenciadas pelo método laboratorial escolhido para a detecção do vírus (NATES, GATTI e LUDERT, 2011). Além do método analítico utilizado, as taxas de detecção podem ser influenciadas pela espécie hospedeira, condições de manejo, virulência da amostra, sazonalidade, ocorrência de infecções concomitantes, estado fisiológico, idade, tamanho da amostragem (MARTINEZ et al., 2010; GANESH et al., 2010; RIBEIRO et al., 2013).

A excreção de PBV nas fezes de humanos tem sido relatada tanto em indivíduos com diarreia como também em hospedeiros assintomáticos. Embora alguns estudos epidemiológicos tenham relatado a presença do vírus em amostras fecais de adultos e crianças com diarreia, a relação etiológica do PBV com a

síndrome diarreica ainda não pode ser estabelecida. Atribui-se a esta relação inconclusiva a escassez de estudos epidemiológicos controlados, os resultados conflitantes das frequências detectadas nos indivíduos sintomáticos e assintomáticos e a associação com outros micro-organismos de patogenia bem esclarecida (GANESH et al., 2010).

Tabela 1: Estudos de detecção de PBV em fezes coletadas de diversas espécies de animais de acordo com a localidade e método diagnóstico

REFERÊNCIA	PAÍS	ESPÉCIE	MÉTODO DE DETECÇÃO
ALFIERI et al., (1988)	Brasil	Aves	EGPA
VANOPDENBOSCH & WELLEMAI (1989)	Bélgica	Bovinos	EGPA
LUDERT et. al., (1991)	Venezuela	Suínos	EGPA/ RT-PCR
BROWNING et al., (1991)	Irlanda e Grã Bretanha	Equinos	EGPA
HAGA et al., (1999)	Brasil	Tamanduá bandeira	EGPA
BUZINARO et al., (2003)	Brasil	Bovinos	EGPA
COSTA et al., (2004)	Brasil	Caninos	EGPA
FREGOLENTE et al., (2009)	Brasil	Repteis	EGPA/ RT-PCR
CARRUYO et al., (2008)	Argentina	Suínos	EGPA/ RT-PCR
GHOSH et al., (2009)	Índia	Bovinos	EGPA/ RT-PCR
MALIK et al., (2011)	Índia	Bovinos e bubalinos	EGPA/ RT-PCR
GANESH et al, (2011)	Índia	Equinos	EGPA/RT-PCR
WANG et al., (2012)	Estados unidos	Macacos	EGPA/ RT-PCR
SILVA et al., (2014)	Brasil	Aves	EGPA/ RT-PCR

A detecção do PBV em co-infecção já foi relatada em casos de diarreia, juntamente com o rotavírus, astrovírus, calicivirus, *Escherichia coli* e *Salmonella*, dificultando a interpretação de que o PBV seja o agente etiológico primário. Entretanto, em um estudo holandês que analisou 84 amostras fecais de pacientes humanos com diarreia de etiologia desconhecida (fezes previamente triadas como negativas para os principais enteropatógenos), O PBV foi detectado como patógeno singular em 21% das amostras (VAN LEEUWEN et al., 2010).

Além disso, é sugerida a associação do PBV em casos de gastroenterite em humanos imunossuprimidos. Foram observadas frequências significativas, quando comparadas ao grupo controle, variando entre 10 a 13% de presença do PBV em amostras de fezes coletadas de pacientes adultos infectados pelo vírus da

imunodeficiência humana (HIV) e com quadro clínico de diarreia (GROHMANN et al., 1993; GIORDANO et al., 1998; GONZALEZ et al., 1998; GIORDANO et al., 1999).

Por outro lado, no Reino Unido, foram encontradas taxas de excreção de PBV muito próximas; 9 e 13% em pacientes com diarreia e sem diarreia, respectivamente (GALLIMORE et al., 1995). Desta forma, a participação deste vírus como agente etiológico primário da diarreia em humanos não está totalmente esclarecida e a possibilidade de que possa atuar como um patógeno secundário oportunista ou um vírus inócuo do trato intestinal tem sido sugerida (NATES, GATTI e LUDERT, 2011).

Bhattacharya et al. (2006) demonstraram uma associação significativa entre a detecção de PBV de perfil curto e casos de diarreia em crianças. Em estudo retrospectivo com abrangência de 26 anos (1977 a 2002), PBV de perfil longo foi detectado em apenas duas das 2.224 amostras diarreicas analisadas, sendo que em uma das amostras havia também a presença do rotavírus. Os autores sugerem que PBV de perfil longo deve ser mais relacionado como um patógeno oportunista do que como agente etiológico primário de diarreia em crianças (GIORDANO et al., 2008).

Entre os animais, os estudos de prevalência de PBV são mais relatados na espécie suína. Gatti et al. (1989) foram os primeiros pesquisadores a investigar a associação do PBV com a síndrome diarreica em animais. Das 912 amostras de fezes de suínos analisadas no Brasil, o PBV foi detectado por EGPA em 15,3% das amostras diarreicas (rotavírus e PBV em 3,1%) e 9,6% em fezes não diarreicas (rotavírus e PBV em 1,9%). Em contraste a este estudo, na Venezuela, Ludert et al. (1991) não demonstraram a associação do PBV com diarreia em suínos. Contrariamente a hipótese inicial, o PBV foi detectado com maior frequência nos animais sem diarreia (12.3%) do que aqueles apresentando quadro clínico diarreico (10%).

Em leitões lactentes há uma prevalência estimada de 10 a 15% utilizando a técnica EGPA. No entanto, devido à baixa sensibilidade desta técnica, os resultados obtidos por RT-PCR demonstram que esta prevalência pode ser quatro vezes maior nesta faixa etária (BÁNYAI et al., 2008; CARRUYO et al., 2008).

Martinez et al. (2010), investigando a ocorrência de PBV em suínos de diferentes idade e condições fisiológicas, encontraram frequências que variaram de 0% em machos adultos até 38% em matrizes durante o período de lactação. Baseado neste estudo os autores sugerem que o PBV estabeleça uma infecção

persistente no hospedeiro suíno, constituída por períodos intermitentes de excreção viral alta, baixa ou nula nas fezes. Ou seja, os animais atuam como carreadores assintomáticos do PBV, constituindo importantes reservatórios da infecção. Além disso, à semelhança que ocorre no hospedeiro humano, a maior prevalência de PBV em suínos ocorreu em animais que passaram por um período de imunossupressão.

Em frangos de corte, a excreção do PBV foi mais associada às fezes com consistência pastosa a líquida (10,4%) quando comparado às fezes com consistência normal (2,2%) (TAMEHIRO et al., 2003). Entretanto, Silva et al. (2013) detectaram por EGPA, 15,3% de positividade em amostras fecais de animais assintomáticos. Porém, quando submetidas à RT-PCR o percentual de amostras positivas elevou para 49,4%.

Em todos os estudos envolvendo animais de cativeiro, não houve associação do PBV com diarreia, sugerindo que estes animais atuem como reservatórios ou portadores assintomáticos persistentes, enquanto nos animais domésticos o PBV participe como patógeno oportunista (MALIK et al., 2014).

A detecção de PBV atípicos (perfil eletroforético curto) em amostras de fezes humanas (GALLIMORE et al., 1995) e de bezerros (VANOPDENBOSCH & WELLEMANS, 1989) juntamente com oocistos de *Cryptosporidium parvum*, resultaram na hipótese de que o protozoário poderia ser o hospedeiro do PBV. Khramtsov et al. (2000), relataram a presença de RNA bissegmentado em oocistos purificados de *Cryptosporidium parvum*, em um total 32 isolados de *C. parvum*, 16 de seres humanos (5 portadores HIV) e 16 de bezerros.

Entretanto, com a obtenção e análise de VLPs (*virion-like particles*) de PBV obtidos em sistema de expressão em baculovírus, foi demonstrado que existe uma alta similaridade estrutural entre o PBV e os partitivírus. O partitivírus é um vírus constituinte da família *Birnaviridae* que também possui genoma dsRNA bissegmentado, capaz de infectar plantas e organismos unicelulares como o *Cryptosporidium sp.* Desta forma, Duqueroy et al. (2009) sugeriram que os PBV tenham sido derivados destes vírus que infectam protozoários.

2.3 Patogenia

A participação do PBV como agente causal das diarreias é bastante controversa. Embora frequentemente detectado nas fezes de diferentes hospedeiros, ainda não foi possível atribuir conclusivamente ao PBV a causalidade da diarreia. Poucos estudos epidemiológicos controlados têm sido conduzidos na tentativa de descrever a infecção natural pelo PBV.

Haga et al. (1999), em análises semanais, relataram a eliminação do PBV, durante quatro meses nas fezes de tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*) mantidos em cativeiro em um zoológico do Brasil, sugerindo a participação do vírus em infecções crônicas ou persistentes. Pesquisas com tatus e orangotangos de um zoológico na Argentina, confirmaram a excreção intermitente do PBV por um período de seis a sete meses, respectivamente (MASACHESSI et al., 2007). De forma semelhante, também já foram relatados longos períodos de excreção do PBV nas fezes de humanos infectados pelo HIV (GROHMANN et al., 1993; GIORDANO et al., 1999).

Nos estudos experimentais realizados com ratos infectados com o PBV, foram observadas descamações discretas no ápice das vilosidades do jejuno, demonstrando a permissibilidade dos enterócitos à infecção e à replicação viral. Os animais inoculados excretaram os vírus nas fezes caracterizadas como não diarreicas. Portanto, neste modelo animal, PBV pode causar a infecção sem determinar sinais de diarreia (FREITAS, 2003).

Recentemente, a análise filogenética do segmento 2 de PBV (genogrupo I) provenientes de humanos e suínos demonstrou uma alta similaridade (94 a 100% de identidade) entre as sequências destas espécies hospedeiras, evidenciando a possibilidade de transmissão interespecie e a sugestão do potencial zoonótico (GANESH et al., 2010). Em outro estudo realizado por Ganesh et al. (2011), a comparação da sequência de um PBV detectado em equino revelou alta relação genética (> 98% de identidade de nucleotídeos) com uma amostra de PBV humana detectada na mesma região da Índia.

Em detrimento da não adaptação do PBV em culturas celulares *in vitro*, as propriedades antigênicas e os mecanismos de patogenicidade viral ainda são pouco esclarecidos (NATES, GATTI e LUDERT, 2011). Desta forma, os estudos mais recentes têm recorrido às técnicas moleculares de caracterização genômica que

possam elucidar os aspectos de variabilidade genética, transmissão interespecie e de existência dos PBV como quasiespécies. São necessários novos estudos para elucidar os mecanismos de virulência e patogenicidade do PBV, incluindo possíveis modelos experimentais que caracterizem o potencial patogênico desse vírus.

2.4 Diagnóstico laboratorial

Uma vez que ainda não foram estabelecidas linhagens celulares ou modelos animais permissivos para a amplificação do PBV, testes imunodiagnósticos para a detecção e/ou caracterização do PBV ainda não estão disponíveis (FREGOLENTE, 2009). As técnicas rotineiramente utilizadas para a detecção de PBV são a EGPA e a RT-PCR.

Para vírus com genomas segmentados, tais como o rotavírus (11 segmentos) e o PBV (dois segmentos), a EGPA seguida pela coloração por nitrato de prata pode ser eficientemente aplicada para a detecção dos segmentos genômicos bem como para a caracterização do eletroferogrupos destes vírus (PEREIRA et al., 1988a). A EGPA é considerada a técnica padrão ouro para o diagnóstico do PBV, permitindo a separação dos dois segmentos genômicos de dsRNA de acordo com o tamanho dos fragmentos. Contudo, a escolha e otimização do método de extração de dsRNA nas amostras de fezes são fundamentais para aumentar a sensibilidade da técnica, pois são requeridos altos títulos de excreção viral para a visualização do genoma no gel de poliacrilamida (NATES, GATTI e LUDERT, 2011).

A ampla utilização de EGPA para pesquisa de PBV tem demonstrado diferentes mobilidades eletroforéticas nas amostras estudadas, sendo bem caracterizados os perfis curto e longo de PBV. Para o perfil longo, os tamanhos estimados dos Segmentos 1 e 2 dos PBV são de 2,3 a 2,6 kpb e de 1,5 a 1,9 kpb, respectivamente (GATTI et al., 1989). O perfil curto tem o maior segmento com 1,75 kpb e o menor com 1,55 kpb. Para o diagnóstico de PBV, são frequentemente utilizados genomas de estirpes padrão como marcadores moleculares em géis de poliacrilamida. Na migração eletroforética de PBV, em comparação com padrões de migração de rotavírus grupo A, o segmento maior fica ligeiramente acima do gene

da VP2 e enquanto o segmento menor tem migração entre o gene VP4 e NSP1 do rotavírus (GHOSH, et. al, 2009).

Devido à baixa sensibilidade da EGPA, a RT-PCR tem sido muito utilizada para a detecção de PBV em amostras fecais de diferentes espécies hospedeiras. Outra vantagem da técnica é a possibilidade de realizar a caracterização genômica e análise filogenética das amostras de PBV (CARRUYO et al., 2008; FREGOLENTE et al., 2009; GHOSH et al., 2009).

Foram desenhados dois pares de oligonucleotídeos iniciadores, os *primers*, para detectar e diferenciar os dois genogrupos de PBV tendo como alvo o gene RdRp viral (ROSEN et al., 2000). Os pares de *primers* denominados PicoB25/PicoB43 e PicoB23/PicoB24 tem sido mundialmente utilizados para identificação de PBV do genogrupo I e II, respectivamente (Tabela 2) (GANESH et al., 2010). Embora esses pares de *primers* tenham sido originalmente desenhados a partir de protótipos PBV humanos, os mesmos têm sido amplamente utilizados para validar diversos estudos com diferentes espécies hospedeiras (MARTINEZ et al., 2003; GHOSH et al., 2009; FREGOLENTE et al., 2009; GANESH et al., 2010). Bhattacharya et. al. (2006), sugeriram que existe uma relação entre PBV de perfil curto e casos de diarreia em humanos, e que apenas PBV de perfil curto são amplificados com o par de iniciadores do genogrupo II (PicoB23/PicoB24). Entretanto, ainda não foi conduzido nenhum estudo semelhante para comprovar esta hipótese.

Tabela 2: Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores para a caracterização de genogrupos de PBV por RT-PCR, desenhados a partir de vírus identificados em fezes de humanos (ROSEN et al., 2000)

Identificação dos iniciadores	Posição (nucleotídeo)	Sequência (5'-3')	Genogrupo
PicoB25	665-679	TGG TGT GGA TGT TTC	Genogrupo I
PicoB43	850-865	A(GA)T G(CT)T GGT CGA ACT T	
PicoB23	685-699	CGG TAT GGA TGT TTC	Genogrupo II
PicoB24	1039-1053	AAG CGA GCC CAT GTA	

A aplicação de RT-PCR para estudos epidemiológicos indicam que a prevalência de PBV nas populações previamente estudadas pode ser muito maior que o estimado pela EGPA. Devido à alta variabilidade genética dos PBV, os pares de *primers* disponíveis ainda falham para amplificar algumas amostras que são claramente positivas em EGPA (CARRUYO et al., 2008; BÁNYAI et al., 2008;

MARTINEZ et al., 2010). Desta forma, embora a EGPA apresente uma sensibilidade inferior à RT-PCR, permanece como uma importante ferramenta para a detecção de PBV pois é capaz de detectar todas as variantes de PBV circulantes.

2.5 Picobirnavírus bovino

Ao contrário das pesquisas em hospedeiros humanos e suínos, os estudos epidemiológicos e moleculares de PBV em bovinos são raros na literatura nacional e internacional.

O primeiro indício de PBV associado à diarreia em bovinos foi feito em 1989 por Vanopdenbosch e Wellemans. Em 2003, no Brasil, foi detectado o genoma bissegmentado típico do PBV em 0,69% (4/576) das fezes de bezerros analisadas por EGPA. Das quatro amostras positivas, duas foram obtidas de bezerros com diarreia provenientes de um rebanho com rotavírus circulante (BUZINARO et al., 2003).

Após, somente dois outros estudos de detecção de PBV em fezes de bezerros foram realizados por Malik et al. (2011) e Mondal et al. (2013) na Índia com frequências de 7,14% (1/14) e 2,2% (1/45), respectivamente. Em ambos os trabalhos, o método analítico de detecção do PBV foi a EGPA e as amostras positivas eram representativas de animais com diarreia e de rebanhos infectados pelo rotavírus bovino. Os mesmos autores também identificaram o PBV em fezes de búfalos jovens (com menos de 3 meses de idade), com frequências de 4,4% (3/68) (MALIK, et al, 2011) e 3,3% (4/122) (MONDAL et al., 2013).

No Brasil, desde o relato de Buzinaro et al. (2003), não foi realizado nenhum estudo de PBV em populações bovinas estudada. Até o momento estão disponíveis apenas onze sequências parciais representativas de PBV de origem bovina em bancos públicos de dados, sendo nove delas originárias de bovinos da Índia e uma proveniente de uma vaca (PBV/cow/tottori7944/Jap/2013) do Japão. Entretanto, foi publicado apenas um estudo de caracterização molecular de PBV bovino da Índia, referente à amostra RUBV-P detectada em fezes diarreicas de um bezerro (GHOSH et al., 2009). A análise molecular do gene que codifica o Segmento 2 da amostra RUBV-P revelou um elevado grau de diversidade genética com PBV detectados em fezes de humanos, suínos, cães, ratos e répteis. A identidade de nucleotídeos entre

a sequência da RUBV-P e sequências de PBV humanas e suínas foi de apenas 51,2-64,9% e 52-60%, respectivamente. Quando comparada às sequências de cães, ratos e répteis a identidade de nucleotídeos foi de 57,3-59,4%, 52-60,6% e 55,3%, respectivamente. Uma vez que nenhuma outra sequência de PBV bovina estava disponível em bancos públicos de dados, o autor não conseguiu evidenciar a heterogeneidade genética entre PBV de bovinos (GHOSH et. al, 2009).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a presença do Picobirnavírus em fezes de bezerros naturalmente infectados apresentando ou não diarreia no estado do Paraná e realizar análise molecular por sequenciamento dos fragmentos amplificados pela reação de RT-PCR.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar a frequência de ocorrência do Picobirnavírus em fezes de bovinos pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA);
- Correlacionar à ocorrência de Picobirnavirus em fezes com e sem diarreia;
- Avaliar a ocorrência de co-infecções de Picobirnavirus e *Cryptosporidium spp*;
- Amplificar por RT-PCR o gene da RdRp do Picobirnavírus previamente triados pela EGPA; Sequenciar e realizar análises filogenéticas dos produtos amplificados por RT-PCR.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostras de fezes

No período compreendido entre maio de 2012 a janeiro de 2014 foram coletadas, diretamente da ampola retal, 289 amostras de fezes diarreicas e não diarreicas de bezerros, entre 5 e 60 dias de idade, provenientes de rebanhos de aptidão leiteira de quatro municípios do estado do Paraná. As amostras fecais foram classificadas como diarreicas (n=176) quando apresentavam consistência líquida e não diarreicas (n=113) aquelas com consistência pastosa ou sólida.

4.2 Extração bruta de fezes

As amostras foram diluídas em solução tampão de estabilização de rotavírus (TERV), pH 7,4 (Tris-HCl 50 mM; NaCl 10 mM; 2-mercaptoetanol 1,5 mM; CaCl₂ 3 mM) com concentração final de 10 a 20% (p/v), homogeneizadas por agitação mecânica vigorosa, centrifugadas a 2.000 rpm por 10 minutos, tendo o sobrenadante recolhido e estocado a -4°C para posterior análise.

4.3 Extração de ácido nucléico viral

Para a extração do ácido nucléico viral foi utilizado a associação das técnicas fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e sílica/tiocianato de guanidina, conforme descrita por Alfieri et al., (2004). Alíquotas de 500 µL das suspensões fecais diluídas em TERV foram tratadas com sódio dodecil sulfato (SDS) 1% e mantidas em banho-maria a 56°C por 30 minutos. Após, à cada amostra foi adicionado igual volume da solução fenol-clorofórmio-álcool isoamílico, homogeneizada por agitação mecânica, incubada em banho-maria a 56°C por 15 minutos e centrifugada a 10.000 rpm por 10 minutos (SAMBROOK et al., 1989). A fração aquosa obtida foi submetida ao tratamento com sílica e tiocianato de guanidina, conforme descrito por BOOM et al. (1990). Os ácidos nucleicos extraídos foram eluídos da matriz de sílica em 50 µL de água ultrapura (MilliQ, Bedford, MA, USA) autoclavada e mantidos a -20°C para posterior uso. Para a certificação e

validação dos procedimentos de extração realizados, foram incluídas amostras de água ultrapura autoclavada como controle negativo e amostras de fezes rotavírus positivas como controle positivo.

4.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA)

Os ácidos nucleicos extraídos foram submetidos à EGPA a 7,5% seguida pela coloração por nitrato de prata para a detecção e avaliação dos perfis eletroforéticos do RNA bissegmentado do PBV, de acordo com metodologia descrita Herring et al. (1982) e Pereira et al. (1988a).

4.5 RT-PCR para detecção de Picobirnavirus

Todas as amostras de fezes detectadas positivas para PBV em EGPA foram submetidas à RT-PCR. O par de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) denominados PicoB24 (+) e PicoB43 (-) foram utilizados para amplificar um fragmento de 201 pb do gene RdRp (segmento genômico 2) do PBV genogrupo I (ROSEN et al., 2000). A sequência de nucleotídeos dos referidos *primers* e a posição no genoma viral estão especificadas na Tabela 3.

Tabela 3: Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores para amplificação genômica parcial do segmento 2 do PBV genogrupo I por RT-PCR

Primer	Posição (nucleotídeos)	Sequência (5'-3')	Polaridade
PicoB25	665-679	TGG TGT GGA TGT TTC	+
PicoB43	850-865	A(GA)T G(CT)T GGT CGA ACT T	-

Para a obtenção do DNA complementar (cDNA), primeiramente 6 µL do dsRNA extraídos foram adicionados a 2 µL do *primer* PicoB25 à concentração de 20 pmol (Invitrogen Life Technologies) e 2 µL de água ultrapura autoclavada, seguido de desnaturação a 94° C por 5 minutos. Após esse período as amostras foram imediatamente imersas em banho de gelo por 5 minutos, seguido da adição de 15 µL de uma solução denominada RT-Mix contendo 1 x RT buffer (250 mM Tris-HCl pH 8,3; 375 mM KCl; 15 mM MgCl₂; 50 mM de dietiltreitol) , 0,1 mM de cada dNTP (EasyGen®), 120 unidades da enzima M-MLV *Reverse Transcriptase* (Promega

Corporation) e água ultrapura autoclavada para a obtenção de um volume final de 25 µL. A mistura foi incubada a 37° C por 50 minutos seguida de etapa para inativação da enzima a 70° C por 15 minutos.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada com a adição de 25 µL de solução PCR-Mix contendo 1x PCR buffer (20 mM Tris-HCl pH 8,4; 50 mM KCL), 2 mM de MgCl₂, 0,2mM de cada dNTP, 1 µL do primer PicoB25 e 2 µL do primer PicoB45, ambos à 20 pmol; 2.5 unidades da enzima *Platinum Taq* DNA polimerase (Invitrogen Life Technologies) e água ultrapura autoclavada para completar um volume final de 50 µL. A reação de amplificação foi realizada em termociclador (My-Genie 96 Thermal Block (Bioneer)) com as seguintes condições de tempo e temperatura: uma etapa 94° C por 2 minutos, seguida de 40 ciclos de 1 minuto a 94° C (desnaturação), 1 minuto a 50°C (anelamento) e 1 minuto a 72°C (extensão). A etapa de extensão final ocorreu a 72° C por 7 minutos.

4.6 Análise dos produtos da RT-PCR

Alíquotas com 10 µL dos produtos da RT-PCR foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 2% em tampão TBE pH 8,4 (89 mM Tris; 89 mM ácido bórico; 2 mM EDTA), sob voltagem constante (100V) durante aproximadamente 30 minutos. O gel foi posteriormente corado em solução de brometo de etídio 0,5 µg/mL para visualização dos *amplicons* em transiluminador UV e fotodocumentação digital (Fotodocumentador L-Pix Touch – Loccus).

4.7 Sequenciamento e análise filogenética

O sequenciamento dos fragmentos de DNA amplificados foi realizado no Laboratório de Virologia da Universidade Estadual de Londrina sob a coordenação do Prof. Dr. Amauri Alcindo Alfieri. Os produtos amplificados foram purificados utilizando o kit PureLink® Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen, 17 Carlsbad, CA, USA), e a quantificação do DNA foi feita com fluorômetro Qubit™ (Invitrogen Life Technologies). A reação de sequenciamento de DNA foi realizada com BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems®), em ambas as

direções, no analisador genético automático modelo ABI 3500 (Applied Biosystems®).

A qualidade das sequências obtidas foi avaliada pelo programa Phred (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>) e a identidade dos produtos foi comparada com as sequências depositadas em bases públicas de dados (GenBank) utilizando o programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). As sequências nucleotídicas obtidas foram alinhadas com as sequências de referência através do programa ClustalW. Os alinhamentos foram editados e corrigidos manualmente no programa BioEdit versão 7.1.3.0. Para avaliação filogenética foi incluída a sequência parcial do gene RdRp do PBV bovino obtida neste estudo com sequências de PBV bovino de outra região geográfica (Índia) além de PBV isolados de outras espécies animais. A árvore filogenética foi construída com o programa MEGA versão 6.0 (TAMURA et al., 2013) utilizando o algoritmo Neighbor-Joining a partir de distâncias estimadas pelo método de Kimura 2 parâmetros. A robustez da inferência filogenética sugerida foi avaliada através do método de bootstrapping (com base em 1000 réplicas).

4.8 Pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* spp

Para a determinação de co-infecções PBV/*Cryptosporidium*, todas as amostras de fezes que resultaram positivas para PBV na EGPA foram avaliadas quanto à presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. Cerca de 5 g de fezes foram diluídas em 40 mL de água e posteriormente filtradas em gaze dobrada para outro recipiente, para remoção das partículas sólidas. Em seguida, uma pequena alíquota do obtido filtrado foi centrifugada por dois minutos a 2.500 rpm, descartando-se o sobrenadante. As lâminas foram confeccionadas utilizando o sedimento.

Após a secagem da lâmina foi realizado o método de coloração de Ziehl-Neelsen modificado (ORTOLANI, 2000), que inclui as seguintes etapas: 1) Fixação com Metanol 96% por cinco minutos; 2) Secagem em temperatura ambiente; 3) Coloração com carbol-fucsina por 20 minutos; 4) Lavagem em água corrente para retirar o excesso do corante; 5) Descoloração com uma solução de ácido sulfúrico 2,5% por 30 segundos; 6) Contracoloração utilizando o corante verde malaquita por

cinco minutos; 7) Lavagem em água corrente para retirar o excesso do corante; 8) Secagem em temperatura ambiente.

A leitura das lâminas foi realizada em um microscópio de luz com ampliação de 1000 vezes, utilizando a objetiva de imersão.

4.9 Análise estatística

Para verificar a associação entre as variáveis estudadas foi utilizado o teste do qui-quadrado considerando como nível de significância valor de $p < 0,05$. A análise estatística foi efetuada pelo programa Epi Info® versão 7.0 (Centers for Diseases Control and Prevention, Atlanta, EUA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Detecção de Picobirnavírus em EGPA

De um total de 289 amostras de fezes de bezerros avaliadas, o PBV foi detectado em 24 delas (8,3%) pela técnica EGPA, distribuídos entre fezes diarreicas e não diarreicas conforme demonstrado na Tabela 4.

Tabela 4: Distribuição dos resultados positivos para PBV em EGPA de acordo com a consistência das fezes.

Consistência Fezes	PBV positivas EGPA (%)	PBV Negativas EGPA (%)
Diarreicas	18 (75%)	158 (60%)
Não diarreicas	6 (25%)	107 (40%)
Total	24	265

$\chi^2=1.587$ $p=0.2077$

À semelhança desse estudo, os relatos de PBV bovino descritos foram decorrentes de achados ocasionais durante a pesquisa de rotavírus bovino nas fezes diarreicas e não diarreicas de animais infectados. Ainda que os relatos de prevalência de PBV bovino sejam bastante escassos na literatura mundial, a porcentagem de 8,3% (24/289) encontrada neste estudo foi muito superior à encontrada por outros autores que também utilizaram a EGPA como ferramenta

diagnóstica. Ao contrário dos diversos estudos epidemiológicos envolvendo o PBV humano e suíno, até o momento foram descritos apenas quatro relatos da presença de PBV nas fezes de bovinos ou búfalos: um na Bélgica (VANOPDENBOSCH e WELLEMANS, 1989), um no Brasil (BUZINARO et al., 2003) e dois na Índia (GOSH et al., 2009; MALIK et al., 2011).

Ghosh et. al. (2009), na Índia, numa análise de 78 amostras fecais de bezerros, detectaram o PBV em apenas uma amostra (1,28%) proveniente do único bezerro que apresentava sinal clínico diarreico. Em um estudo realizado por Malik et al., (2011), analisando fezes de búfalos e bovinos com idade inferior a três meses, em um período de três anos, também na Índia, encontraram um percentual de 3,67% (5/136) de amostras positivas para PBV. Das cinco amostras PBV positivas, três eram de bezerros búfalos e uma de bezerro, e todos com sinais clínicos de diarreia aguda. Em apenas uma amostra não-diarreica de búfalo foi detectada a presença de PBV.

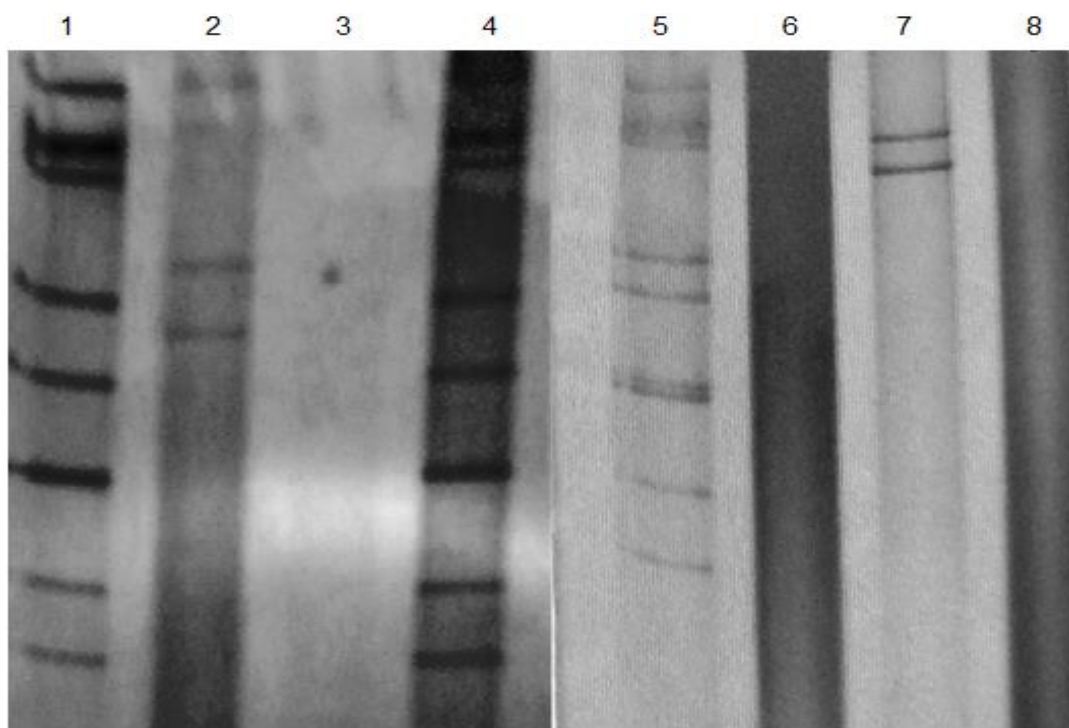
No Brasil, foi descrito apenas um estudo de prevalência de PBV bovino. Buzinaro et al.(2003), identificaram o PBV em apenas quatro amostras (0,76%) das 576 testadas (diarreicas e não diarreicas) de bezerros com idade variando entre 1 e 45 dias em rebanhos leiteiros no estado de São Paulo.

No presente estudo, das 24 amostras PBV identificadas, todas eram provenientes de bezerros com idade inferior a 60 dias, das quais 75% (18/24) eram representativas de animais com quadro clínico de diarreia. Baseado em estudos epidemiológicos na espécie humana, a participação do PBV como agente causal das diarreias é ainda controversa. Embora alguns estudos descrevam a presença do vírus em amostras fecais de adultos e crianças com diarreia, a relação etiológica do PBV com a síndrome diarreica ainda não pode ser estabelecida, uma vez que também já foi relatada a presença do agente em hospedeiros assintomáticos (GANESH et al., 2010). Em pacientes imunocomprometidos, portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV), é sugerida por diversos autores a associação do PBV em casos de diarreia (GROHMANN et al., 1993; GONZÁLEZ et al., 1998; GIORDANO et al., 1999; ROSEN et al., 2000; MARTÍNEZ et al., 2003). Van leeuwen et. al.. (2010) analisando amostras de fezes de humanos com diarreia encontrou 21% (17/84) de amostras positivas para PBV. Assim, os PBV são atualmente relacionados como patógenos emergentes e oportunistas em casos de diarreia, principalmente em indivíduos imunocomprometidos. Recentemente, também foi

sugerido o potencial zoonótico destes vírus após comparação de sequências de nucleotídeos de PBV identificados em humanos e em animais (GANESH et al., 2010). Apesar da frequência de PBV associado a bezerros diarreicos tenha demonstrado ser expressiva, não podemos concluir que o patógeno tenha sido o agente primário da diarreia. Embora tenham sido previamente triadas negativas para o rotavírus bovino (dados não mostrados), outros patógenos comumente encontrados nesta faixa etária, tais como coronavírus bovino e *Eimeria spp*, não foram pesquisados. Entretanto, a análise estatística utilizando o teste do qui-quadrado não demonstrou diferença significativa ($p>0,05$), entre amostras diarreicas e não diarreicas.

De acordo com o perfil de migração dos dois segmentos de dsRNA em EGPA, o PBV pode ser classificado em perfil eletroforético curto ou longo. No PBV de perfil curto, o maior segmento possui 1,75 kpb e o menor 1,55 kpb. Para o perfil longo, os tamanhos estimados dos segmentos maior e menor dos PBV são de 2,3 a 2,6 kpb e de 1,5 a 1,9 kpb, respectivamente (GATTI et al., 1989). Neste estudo, ambos os perfis foram detectados pela análise dos géis após a EGPA (Figura 2).

Figura 2: Eletroforese em gel de poliacrilamida seguida pela coloração por nitrato de prata de dsRNA de picobirnavirus (PBV) e rotavírus A (RVA) extraídos de amostras fecais de bezerros. Linhas 1,4 e 5: padrão de migração (4-2-3-2) de dsRNA de RVA; Linha 2: perfil eletroforético longo de PBV; Canaleta 7: perfil eletroforético curto de PBV; Linhas 3, 6 e 8: amostras negativas



Frequentemente os perfis curto e longo são identificados comparando a migração eletroforética dos dois segmentos do PBV com o padrão de migração (4-2-3-2) do dsRNA do RVA. Os segmentos do PBV perfil curto tendem a migrar entre os segmentos 4 e 6 do RVA e os do PBV perfil longo entre os segmentos 3 e 5 do RVA. Das 24 amostras de fezes positivas em EGPA, cinco delas apresentaram um perfil eletroforético longo e 19 amostras apresentaram o perfil curto. A distribuição dos perfis de PBV entre amostras diarreicas e não diarreicas está indicada na Tabela 5.

Tabela 5: Distribuição de amostras PBV positivas em eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA), de acordo com a consistência das fezes e perfil de migração eletroforético.

Características Fezes	Perfil eletroforético		Total (%)
	Curto (%)	Longo (%)	
Diarreicas	14 (73,7)	4 (80)	18 (75)
Não diarreicas	5 (26,3)	1 (20)	6 (25)
Total	19 (79,2)	5 (20,8)	24 (100)

$\chi^2=0.084$ $p=0.7717$

Como observado na tabela anterior o perfil longo para PBV, teve menor incidência em nossos achados (20,8%). Pereira et al. (1993) relataram a ocorrência de PBV perfil longo em fezes de humanos tanto em fezes diarreicas quanto não diarreicas em apenas 0,45% das amostras. Giordano et al. (2008) num estudo que envolveu a análise retrospectiva de géis de poliacrilamida, relacionaram o PBV perfil longo em apenas duas das 2224 amostras fecais analisadas, referentes a crianças com diarreia, relatando uma ocorrência de 0,09%. Diante desse resultado, os autores sugeriram que o PBV perfil longo possa estar mais envolvido como um patógeno oportunista do que como agente etiológico primário de diarreia em crianças.

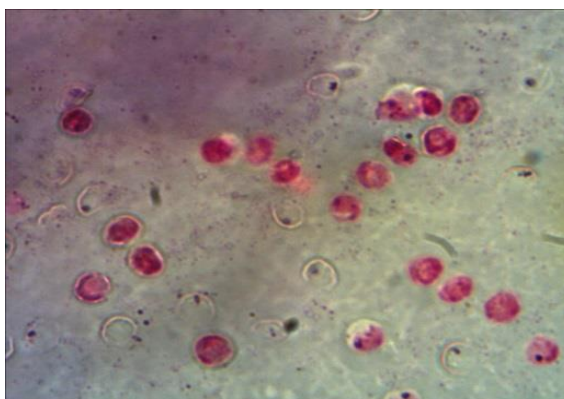
Em contraste, o PBV perfil curto foi detectado em 73,7% (19/24) das amostras analisadas. Este resultado concorda com outros trabalhos publicados, associando o perfil curto como o mais identificado no diagnóstico de PBV por EGPA. Bhattacharya et al. (2007) relataram a prevalência de PBV perfil curto em 2,47% das fezes diarreicas de crianças em Calcutá, Índia, demonstrando uma associação significativa entre o PBV perfil curto e a ocorrência de diarreia nas crianças avaliadas. Entretanto, a análise estatística utilizando o teste do qui-quadrado não demonstrou diferença significativa ($p>0,05$), entre amostras diarreicas e perfil curto. Na espécie

bovina todos os trabalhos relataram a presença do perfil curto nas amostras analisadas (VANOPDENBOSCH E WELLEMANS, 1989; BUZINARO et al., 2003; GHOSH et al., 2009, MALIK et al.,2011, MALIK et al.,2013) sendo este o primeiro a detectar amostras de PBV perfil longo em bovinos naturalmente infectados.

5.2 Co-infecção PBV/*Cryptosporidium* spp

Das 24 amostras positivas para PBV, sete (29,17%) apresentaram oocistos de *Cryptosporidium* spp (Figura 3), e nestas, somente foram identificados PBV com perfil eletroforético curto. Gallimore et al. (1995) já haviam sugerido a associação destes enteropatógenos em casos de diarreia em humanos, quando encontrou o perfil curto juntamente com oocistos de *Cryptosporidium parvum* em amostras de fezes de humanos, sugerindo a associação do vírus a este parasita. Neste mesmo estudo, num total de 54 amostras de fezes de humanos que continham os oocistos de *Cryptosporidium* típicos de *C. parvum*, os autores encontram 20 amostras co-infectadas com o PBV, perfil curto.

Figura 3: Oocistos de *Cryptosporidium* spp corados pela técnica de Ziehl Nielsen em amostra de fezes de bezerro positiva para Picobirnavírus



PBV tem sido relatado em co-infecções com outros patógenos. COSTA et al.(2004) ao analisarem 163 amostras de fezes de cães com diarreia por EGPA constataram que em cada três amostras de cães com menos de seis meses de idade duas eram positivas para PBV. E destas amostras PBV positivas uma era também positiva para parvovírus canino. Estes resultados reforçam a hipótese de que os PBV estão associados a quadros de imunossupressão.

No entanto, devido à escassez de conhecimento sobre a epidemiologia do PBV, principalmente em bovinos, e seu envolvimento nos quadros de diarreia em infecções singulares ou mistas, ainda não é possível estabelecer a relação do PBV e *Cryptosporidium* spp. nos episódios de diarreia neonatal em bezerros.

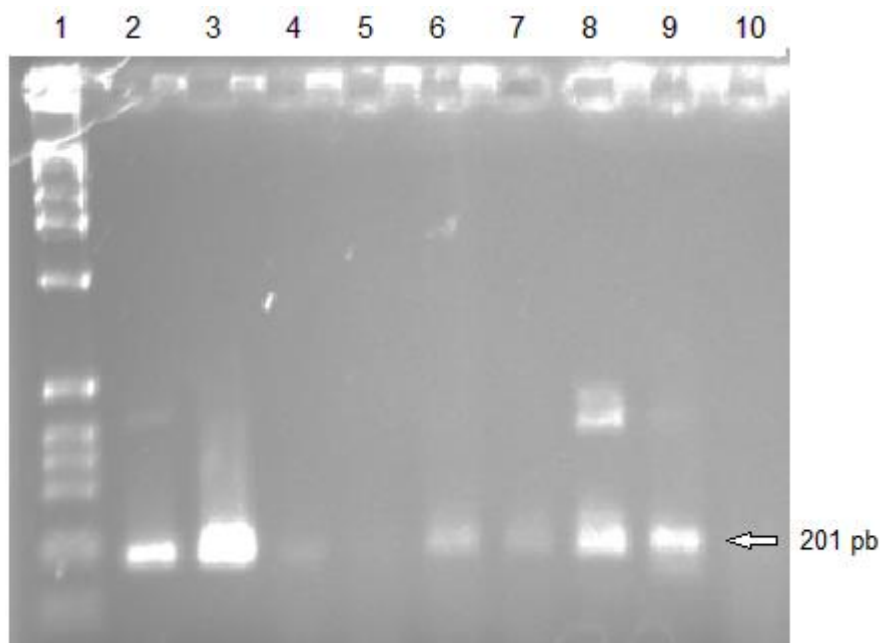
5.3 RT-PCR e sequenciamento de PBV

Todas as amostras fecais positivas em EGPA foram submetidas à RT-PCR utilizando o par de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) PicoB25 e PicoB43 (genogrupo I). Das 24 amostras de fezes positivas em EGPA, 15 (62,5%) resultaram em amplificados de 201 pares de bases (bp), referente ao gene RdRp (segmento 2) específico para o PBV genogrupo I (Figura 4). Nove amostras não apresentaram qualquer produto amplificado com a utilização deste par de *primers*. O insucesso na amplificação pode sugerir possíveis falhas decorrentes da degradação do RNA viral, presença de inibidores da reação de PCR presente nas fezes ou ainda que estes PBV possam pertencer ao Genogrupo II. Entretanto, uma vez que estas amostras não foram testadas com o par de *primers* específicos para o genogrupo II, não é possível atribuir esta classificação a estes PBV.

Este é o primeiro trabalho de detecção por RT-PCR e caracterização molecular de PBV bovino no continente americano. No mundo, apenas dois estudos moleculares de PBV bovino foram descritos na Índia (GOSH et al., 2009; MALIK et al., 2014). No Brasil, o único estudo envolvendo o PBV bovino limitou-se à detecção do vírus por EGPA (BUZINARO et al., 2003). Por outro lado, outros estudos brasileiros foram os pioneiros na detecção e caracterização molecular de PBV em amostras fecais de ratos, cães e cobras (FREGOLANTE et al., 2009) e recentemente em aves de exploração comercial (RIBEIRO et al., 2013),

Apenas amostras com o perfil curto foram amplificadas pelo par de iniciadores para o genogrupo I, corroborando com os resultados de Bhattacharya et al. (2007). Estes autores sugeriram que apenas PBV de perfil curto são amplificados com o par de iniciadores do genogrupo I (PicoB25 e PicoB43), desenhados por Rosen et al. (2000).

Figura 4: RT-PCR de PBV bovino a partir de amostras fecais de bezerros previamente triadas pela EGPA. Linha 1: Padrão de tamanho molecular (1kb); linhas 2,3,4,7,6,8 e 9: produto amplificado de 201 bp utilizando o par de primers específico para PBV genogrupo I (PicoB25 e Pico B43); linhas: , linha 10: PBV bovino não amplificadas.



Nesse estudo, cinco dos 15 amplificados por RT-PCR foram submetidos ao sequenciamento. Na análise preliminar das sequências obtidas confrontadas com sequências depositadas em bancos de dados públicos permitiu confirmar a identidade dos produtos amplificados, o gene do RdRp (segmento 2) de PBV genogrupo I.

Entretanto apenas uma das cinco sequências obtidas apresentou qualidade satisfatória para proceder com as análises filogenéticas, recebendo neste estudo a denominação de Bovine PBV18 UFPR Palotina. Esta amostra foi selecionada por apresentar um valor mínimo de 20 para todas as bases nucleotídicas na avaliação do eletroferograma. Para a construção da árvore filogenética, além da sequência obtida nesse estudo, foram utilizadas sequências de PBV provenientes de bovinos e outras espécies como suínos, frangos de corte, peru e humanos disponíveis em bases públicas de dados. Os números de acesso do GenBank das sequências utilizadas estão indicadas na Figura 5.

A análise da matriz de identidade de nucleotídeos demonstrou que a amostra Bovine PBV18 apresentou maior identidade (81%) com PBV detectado em peru

(MD-2010/HM803965) e menor identidade (62,3%) com o protótipo PBV bovino RUBV-P detectado na Índia (RUBV-P/GQ221268). A construção da árvore filogenética ratificou estes resultados, com o agrupamento da Bovine PBV18 no mesmo ramo filogenético que a amostra de PBV de peru e foi suportada com alto valor de *bootstrap* (96%) (Figura 5).

Quando comparado com outras sequências de PBV bovino (P2/JX310440 e P120/JX310441) a identidade de nucleotídeos variou entre 66 a 71%. Curiosamente, a identidade genética da PBV18 foi maior com os PBV de espécies heterólogas: frangos de corte (72 a 75%), suínos (73%) e humanos (72%).

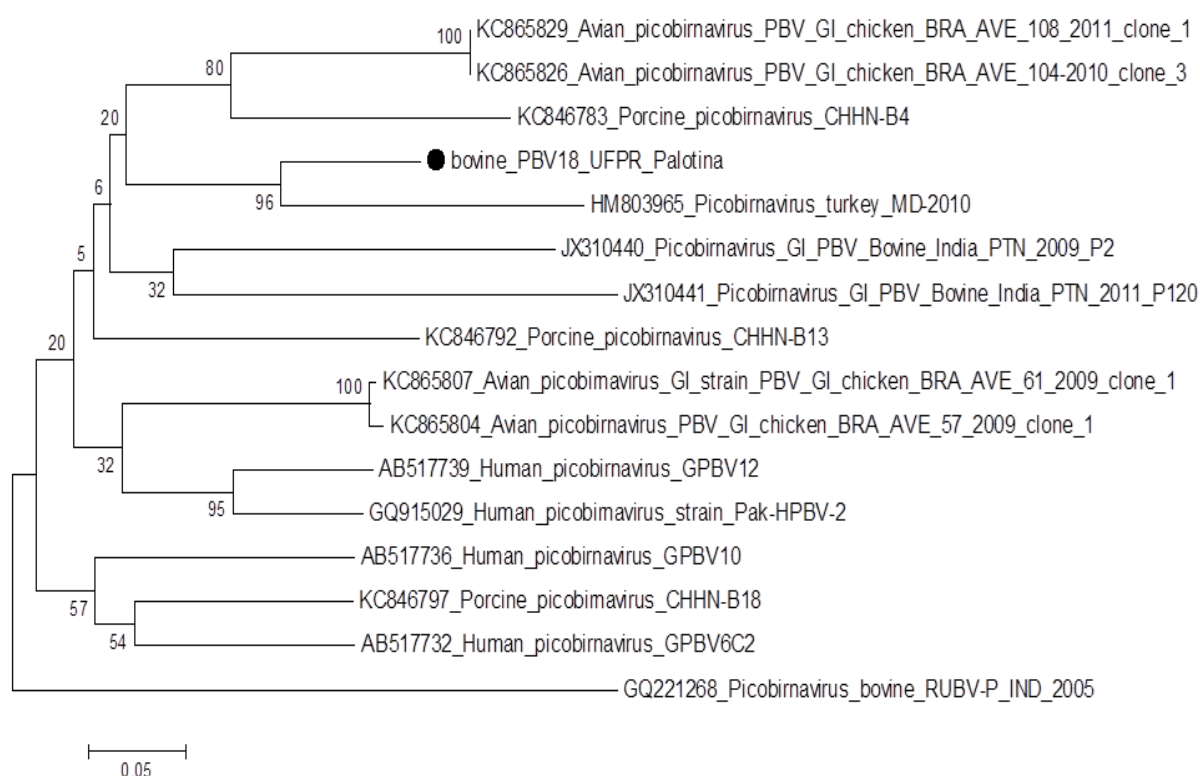
Em 2014, Malik et al., identificaram um PBV bovino (HP-7/JX411964) que apresentou maior identidade de nucleotídeos (78,7%) com uma amostra de PBV humano (3-HUN-01/AJ504796) detectado em um surto de gastroenterite na Hungria. Contudo, semelhantemente ao nosso trabalho, esta amostra também mostrou ser altamente divergente do protótipo bovino RUBV-P, agrupando-se num ramo filogenético distante da amostra bovina HP7.

A alta divergência genética do protótipo de PBV bovino, detectada nas fezes diarreicas de um bezerro de 30 dias, já havia sido descrita pelos próprios autores (GHOSH et al., 2009). Neste trabalho os autores compararam sequência parcial de 168 bp do gene RdRp do RUBV-P com outras isoladas de diversas espécies. A PBV bovina RUBV-P revelou identidade de nucleotídeos de 51,2 a 64,9% e 53,5 a 64,1%, com a espécie suína e humana, respectivamente. As Identidades com PBV detectados em cães, ratos e cobras foram de 57,3 a 59,4%, 55,3% e 52 a 60,6%, respectivamente. Esta baixa identidade genética com outros PBV também foi corroborada pela análise filogenética em que o protótipo RUBV-P constituiu um ramo filogenético distinto dos demais PBV. Entretanto, até a data da referida publicação, não havia sequências de PBV bovino disponíveis que os autores pudessem avaliar a heterogeneidade genética entre os isolados da mesma espécie animal. Recentemente, na análise comparativa de um fragmento de 245 nucleotídeos do gene da RdRp de um PBV isolado de um bezerro bubalino na Índia, este apresentou uma identidade de apenas 23,5% para nucleotídeos e 45,1% para aminoácidos com o protótipo RUBV-P (MALIK et al., 2013).

Conforme demonstrado neste trabalho e por outros na literatura (BHATTACHARYA et al., 2007; BÁNYAI et al., 2008), PBV podem apresentar

sequências de nucleotídeos muito diferentes, mesmo sendo todos classificados como pertencentes ao genogrupo I.

Figura 5: Relação filogenética entre variantes genômicas de PBV do genogrupo I baseada em 199 nucleotídeos do gene RdRp (segmento 2). A sequência obtida neste estudo está indicada pelo símbolo ●. A árvore filogenética foi inferida pelo programa MEGA6 utilizando o método de Neighbor-Joining, com as distâncias evolutivas calculadas pelo método Kimura 2 parâmetros. Valores de bootstrap são indicados próximos aos nós. As barras representam unidades de substituição por nucleotídeo



A caracterização molecular do gene RdRp do PBV bovino revelou um alto grau de diversidade genética até mesmo em PBV envolvendo a mesma espécie, já que as sequências de bovinos apresentaram baixa identidade entre elas. Esta heterogeneidade pode ser explicada pelo tipo de material genético que os PBV apresentam, sendo RNA segmentados que podem facilitar o surgimento de novas estirpes através de rearranjos genômicos ou *reassortments* (PARRISH et. al., 2008; NATES, GATTI e LUDERT, 2011).

Embora atualmente são disponíveis inúmeras sequências parciais do gene RdRp do PBV de diversas espécies animais e seres humanos, ainda é limitado o número de sequências completas em bases públicas de dados que possa permitir uma melhor caracterização molecular destes vírus altamente divergentes. A

continuidade dos estudos é necessária para compreender a relação da alta variabilidade genética na epidemiologia e evolução dos PBV em animais e humanos.

6 CONCLUSÕES

Objetivando a caracterização genética e filogenética de picobirnavírus identificados em amostras de bovinos naturalmente infectados e após sequenciamento parcial do segmento genômico menor, responsável pela codificação da RdRp, pode-se concluir ou mesmo sugerir que:

1. A técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) detectou a presença de PBV nas fezes de bezerros naturalmente infectados, podendo este método ser utilizado para detecção do vírus. A prevalência de PBV bovino neste estudo foi bem superior à encontrada por outros autores.
2. A frequência de PBV associado a bezerros diarreicos foi expressiva, podendo relacionar este vírus a quadros de diarreias, embora não podendo afirmar seu envolvimento nestes quadros como agente primário, pois não foram realizadas diagnósticos para outros enteropatógenos.
3. Através da técnica de EGPA foi possível diferenciar os PBV pelo tipo de migração eletroforética de seus segmentos, o perfil longo foi o primeiro a ser relatado em bovinos no mundo. Já os PBV de perfil curto tiveram uma maior frequência em fezes diarreicas, podendo sugerir que existe uma relação entre PBV de perfil curto e casos de diarreia em bovinos.
4. A co-infecção de PBV com *Cryptosporidium spp.* em bovinos ocorreu apenas para PBV de perfil curto e em animais que apresentavam quadro de diarreia, reforçando a hipótese de que os PBV estão associados a quadros de imunossupressão.
5. Pela técnica de RT-PCR apenas PBV de perfil curto foram amplificados com o par de iniciadores do genogrupo I (PicoB25 e PicoB43), sendo necessários a utilização de outros iniciadores para amplificar PBV de perfil longo.
6. Na análise da sequência obtidas, revelam a proximidade entre sequências de nucleotídeos do segmento menor de PBV identificados em bovinos, com humanos e peru, evidenciando a possibilidade de transmissão interespecie e sugestão do potencial zoonótico.

Em conclusão, Picobirnavírus é um patógeno emergente com vários hospedeiros susceptíveis. Nossos resultados mostram que Picobirnavirus vírus GI poderia ser um patógeno potencial para bovinos, levando a gastroenterite e perdas

econômicas. A continuidade dos estudos é necessária para compreender a relação da alta variabilidade genética na epidemiologia, origem e evolução dos PBV, e a suas implicações a saúde pública, além de estabelecer seu envolvimento em quadros de diarreia neonatal em bezerros.

7 REFERÊNCIAS

ALFIERI, A. F., ALFIERI, A., RESENDE, J. S., e RESENDE, M. A new bisegmented double stranded RNA virus in avian feces. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, n.40, p. 437-440, 1988.

ALFIERI, A.F.; BARREIROS, M.A.B.; LEITE, J.P.G.; RICHTZENHAIN, L.J.; ALFIERI, A.A. G and P genotypes of group A rotavirus strains circulating in calves in Brazil, 1996-1999. **Veterinary Microbiology**, v.99, n.3-4, p.167-173, 2004.

BÁNYAI K, JAKAB F, REUTER G ET AL.: Sequence heterogeneity among human picobirnaviruses detected in a gastroenteritis outbreak. **Archives of Virology**. n.148, p. 2281–2291, 2003.

BÁNYAI, K., MARTELLA, V., BOGDAN, A., FORGACH,P., JAKAB, F. MELEG, E., BÍRÓ,H., MELEGH, B., SZUCS, G. Genogroup I picobirnaviruses in pigs: evidence for genetic diversity and relatedness to human strains. **Journal of General Virology**, n.89, p.534–539, 2008.

BHATTACHARYA R, SAHOO GC, NAYAK MK, SAHADR, SUR D, NAIK TN, BHATTACHARYA SK, KRISHNAN T. Molecular epidemiology of human picobirnaviruses among children of a slum community in Kolkata, India **Journal Of Molecular Epidemiology And Evolutionary Genetics Of Infectious Diseases**, n. 6, p.453-458; 2006.

BHATTACHARYA R, SAHOO GC, NAYAK MK SAHADR, SUR D, NAIK TN, BHATTACHARYA SK, KRISHNAN T. Detection of genogroup I and II human picobirnaviruses showing small genomic RNA profile causing acute watery diarrhoea among children in Kolkata, India. **Journal Of Molecular Epidemiology And Evolutionary Genetics Of Infectious Diseases**, n. 7, p. 229–238, 2007.

BROWNING, G F; CHALMERS, R M; SNODGRASS, D R; BATT, R M; HART, C A;ORMAROD, S E; LEADON, D; STONEHAM, S J; ROSSDALE, P D. The prevalence of theenteric pathogens in diarrhoeic thoroughbred foals in Britain and Ireland. **Equine Veterinary Journal**, n.23,p.405–409, 1991.

BUZINARO, M G; FREITAS, P P S; KISIELLIUS, J J; UEDA, M; JEREZ, J A. Identification of a bisegmented double-stranded RNA virus (picobirnavirus) in calf faeces. **The Veterinary Journal** , n.166 ,p.185-187, 2003.

COSTA, A P; CUBEL GARCIA, R C N; LABARTHE, N V; LEITE, J P G. Detection of doublestranded RNA viruses in fecal samples of dogs with gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, n.56 , p.554-557, 2004.

DUQUERROY, S., DA COSTA, B., HENRY, C., VIGOUROUX, A.; LIBERSOU, S.; LEPAULT, J.; NAVAZA, J., DELMAS, B.,REY, F.A. The picobirnavirus crystal structure provides functional insights into virion assembly and cell entry. **EMBO Journal**. n.28, p.1655–1665, 2009.

FREGOLENTE, M.C.; GATTI, M. S. V: Molecular characterization of picobirnaviruses from new hosts. **Virus Research**, n.143, p.134–136, 2009.

FREITAS, D. **Avanços e perspectivas na caracterização do picobirnavírus: inoculação em linhagens celulares, histologia de intestino de ratos e testes de RT-PCR**. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biologia, Unicamp, pp 76, 2003.

GALLIMORE C, LEWIS D, BROWN D: Detection and characterization of a novel bisegmented double-stranded RNA virus (picobirnavirus) from rabbit faeces. **Archives of Virology**, n.133, p.63–73, 1993.

GALLIMORE CI, APPLETON H, LEWIS D ET AL.: Detection and characterization of bisegmented double-stranded RNA viruses (picobirnaviruses) in human faecal specimens. **Journal of Medical Virology**, n.45, p.135–140, 1995.

GALLIMORE CI, GREEN J, CASEMORE DP, BROWN DW: Detection of a picobirnavirus associated with *Cryptosporidium* positive stools from humans. **Archives of Virology**, n 140, p.1275–1278, 1995.

GANESH, B; NATARAJU, S M; RAJENDRAN, K; RAMAMURTHY, T; KANUNGO, S;MANNA, B; NAGASHIMA, S; SUR, D; KOBAYASHI, N; KRISHNAN, T. Detection of closely related Picobirnaviruses among diarrhoeic children in Kolkata: Evidence of zoonoses? **Journal Of Molecular Epidemiology And Evolutionary Genetics Of Infectious Diseases**, n.10, p.511-516, 2010.

GANESH, B; BANYAO, K.; MASACHESSI, G.; MLADENOVA, Z., NAGASHIMA, S.; GHOSH, S.; NATARAJU, S. M.; PATIVADA, M.; KUMAR, R.; KOBAYASHI, N. Genogroup I picobirnavirus in diarrhoeic foals: can the horse serve as a natural reservoir for human infection? **Veterinary Research**, n.17; p.42:52, 2011.

GATTI, M S; PESTANA DE CASTRO, A F; FERRAZ, M M G; FIALHO, A M; PEREIRA, H G. Viruses with bisegmented double-stranded RNA in pig faeces. **Research in Veterinary Science**, n.47, p.397–398, 1989.

GHOSH, S.; KOBAYASHI, N.; NAGASHIMA, S.; NAIK, T. N. Molecular characterization of full-length genomic segment 2 of a bovine picobirnavirus (PBV) strain: evidence for high genetic diversity with genogroup I PBVs. **Journal of General Virology**, n. 90, p.2519-2524, 2009.

GIORDANO, M. O, MARTINEZ, L. C, RINALDI, D., GÚINARD, S., NARETTO, E., CASERO, R., YACCI, M.R., DEPETRIS, A.R., MEDEOT, S.I., NATES, S.V. Detection of picobirnavirus in HIV infected patients with diarrhea in Argentina. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology**, n.18, p. 380–383, 1998.

Virology, n. 90, p.2519-2524, 2009.

GIORDANO, M. O, MARTINEZ, L. C, RINALDI, D., GÚINARD, S., NARETTO, E., CASERO, R., YACCI, M.R., DEPETRIS, A.R., MEDEOT, S.I., NATES, S.V Diarrhea and enteric emerging viruses in HIV-infected patients. **AIDS Research and Human Retroviruses**, n. 15, p. 1427–1432, 1999.

GIORDANO, M O; MASACHESSI, G; MARTINEZ, L C; BARRIL, P A; FERREYRA, L J; ISA, M B; NATES, S V. Two instances of large genome profile picobirnavirus

occurrence in Argentinian infants with diarrhea over a 26-year period (1977 – 2002). **Journal of Infection** , n. 56, p.371-375,2008.

GONZALEZ, G.G., PUJOL, F.H., LIPRANDI, F., DEIBIS, L., LUDERT, J.E. Prevalence of enteric viruses in human immunodeficiency virus seropositive patients in Venezuela. **Journal of Medical Virology**, n.55, p.288–292, 1998.

GROHMANN, G.S.; GLASS, R.I.; PEREIRA, H.G.; MONROE, S.S.; HIGHTOWER, A.W.; WEBER, R.; BRYAN, R.T. Enteric viruses and diarrhea in HIV-infected patients. Enteric Opportunistic Infections Working Group. **The New England Journal of Medicine**, n 329, p.14–20, 1993.

HAGA, I.R.; MARTINS, S.S.; HOSOMI, S.T. Identification of a bisegmented double-stranded RNA virus (Picobirnavirus) in faeces of giant anteaters (*Myrmecophaga tridactyla*). **The Veterinary Journal**, n. 158, p.234–236, 1999.

HERRING, A.J.; INGLIS, N.F.; OJEH, C.K.; SNODGRASS, D.R.; MENZIES, J.D. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver stained polyacrylamide gels. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 16, p. 473-477, 1982.

ICTV. Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. In: King, A.M.Q.;34 Adams, M.J.; Carstens, E.B.; Lefkowitz, E.J. (Eds.). **Ninth Report of the International 35 Committee on Taxonomy of Viruses**. San Diego: Elsevier Academic Press, 2013.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v.16, n.2, p.111-120, 1980.

LUDERT JE, HIDALGO M, GIL F, LIPRANDI F. Identification in porcine faeces of a novel virus with a bisegmented double-stranded RNA genome. **Archives of Virology**, n.117, p. 97–107, 1991.

LUDERT JE, ABDUL-LATIFF L, LIPRANDI A, LIPRANDI F: Identification of picobirnavirus, viruses with bisegmented double stranded RNA, in rabbit faeces. **Research in Veterinary Science**, n.59, p.222–225, 1995.

MALIK, Y. S., CHANDRASHEKAR, K. M., SHARMA, K., HAQ, A. A., VAID, N., CHAKRAVARTI, S., BATRA, M., SINGH, R. & PANDEY, A. B. Picobirnavirus detection in bovine and buffalo calves from foothills of Himalaya and Central India. **Tropical Animal Health and Production**, n.43, p.1475–1478, 2011

MALIK, Y.S.; KUMAR, N.; SHARMA, K.; SHARMA, A.K.; SIRCAR, S.; JEENA, L.M.; SINGH, N.K.; MONDAL, A.; JOARDAR, S.N.; BALASUBRAMANIAN, G. Molecular Characterization of a Genetically Diverse Bubaline Picobirnavirus Strain, India. **Thai Journal of Veterinary Medicine**, v. 43, n.4, p.609-613, 2013.

MALIK, Y.S.; SHARMA, A.K.; KUMAR, N.; SHARMA, K.; GANESH, B.; KOBAYASHI, N. Identification and characterisation of a novel genogroup II picobirnavirus in a calf in India. **Veterinary Record**, v.174, n.11. 2014.

MARTÍNEZ, L. C; GIORDANO, M.O; ISA, M.B; ALVARADO, L.F.; PAVÁN, J.V.; RINALDI, D.; NATES, S.V.; Molecular diversity of partial-length genomic segment 2 of human picobirnavirus. **Intervirology**, n. 46, p. 207–213, 2003.

MARTÍNEZ, L.C; MASACHESSI, G.; CARRUYO, G.; FERREYRA, L. J.; BARRIL, P.A; ISA, M. B.; GIORDANO, M. O.; LUDERT, J. E.; NATES, S.V.: Picobirnavirus causes persistent infection in pigs. **Journal Of Molecular Epidemiology And Evolutionary Genetics Of Infectious Diseases**, n.10, p.984–988 , 2010.

MASACHESSI, G., MARTÍNEZ, L.C., GIORDANO, M.O.; BARRIL, P.A, ISA, B.M, FERREYRA, L.; VILLAREAL, D.; CARELLO, M.; ASIS, C.; NATES, S.V. Picobirnavirus (PBV) natural hosts in captivity and virus excretion pattern in infected animals. **Archives of Virology**, n.152, p.989–998, 2007.

MONDAL, A.; MAJEE, S. Novel bisegmented virus (picobirnavirus) of animals, birds and humans. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, n.4, p.154-158, 2014

NATES SV, GATTI MS, LUDERT JE. The picobirnavirus: an integrated view on its biology, epidemiology and pathogenic potential. **Future Virology**; n 6(2): p. 223-235, 2011.

ORTOLANI, E.L.. Standardization of the modified Ziehl-Neelsen technique to stain oocysts of *Cryptosporidium* sp. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, n.91, p.29-31. 2000.

PEREIRA, H. G.; FIALHO, A M; FLEWETT, T. H.; TEIXEIRA, J. M .S.; ANDRADE, Z. P. Novel viruses in human faeces. **The Lancet**, n.2, p.103–104, 1988a.

PEREIRA, H.G.; FLEWETT; T.H.; CANDEIAS, J.A.; BARTH, O.M. A virus with a bisegmented double-stranded RNA genome in rat (*Oryzomys nigripes*) intestines. **Journal Of General Virology**, n. 69, p. 2749–2754, 1988b.

PEREIRA, H.G., LINHARES, A.C., CANDEIAS, J.A., GLASS, R.I., National laboratory surveillance of viral agents of gastroenteritis in Brazil. **Pan American Health Organization**, n.27, p.224–233, 1993

PONGSUWANNA, Y.; TANIGUCHI, K.; CHIWAKUL, M. Serological and genomic characterization of porcine rotaviruses in Thailand: detection of a G10 porcine rotavirus. **Journal of Clinical Microbiology**, n.34, p.1050–1057, 1996.

SILVA, R.R.; BEZERRA, D. A.M.; KAIANO, J.H.L.; OLIVEIRA, D. S.; SILVESTRE, R. V. D.; GABBAY, Y. B.; GANESH, B.; MASCARENHAS, J. D. P. Genogroup I avian picobirnavirus detected in Brazilian broiler chickens: a molecular epidemiology study, **Journal of General Virology**, v.95, n.1, p. 117-122, 2013.

ROSEN, B I; FANG, Z Y; GLASS, R I; MONROE, S S. Cloning of human picobirnavirus genomic segments and development of an RT-PCR detection assay. **Virology**, n.277, p.316-329, 2000.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular cloning. **A laboratory manual**. 2. ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SYMONDS, EM, GRIFFIN DW, BREITBART M: Eukaryotic viruses in wastewater samples from the United States. **Applied and Environmental Microbiology**, n 75, p.1402–1409, 2009.

TAMEHIRO, C., ALFIERI, A. F., MEDICI, K.C., ALFIERI, A. A. Segmented double-stranded genomic RNA viruses in fecal samples from broiler chicken. **Brazilian Journal of Microbiology**, n.34, p.349–353, 2003.

VANOPDENBOSCH, E.; WELLEMANS, G. Birna-type virus in diarrhoeic calf faeces. **Veterinary Record**, n.125, p.610, 1989.

VAN LEEUWEN, M.; WILLIAMS, M.M.; KORAKA, P.; SIMON, J.H.; SMITS, S.L.; OSTERHAUS, A.D. Human picobirnaviruses identified by molecular screening of diarrhea samples. **Journal of Clinical Microbiology**; n.48, p.1787-94, 2010.

WANG, Y.; BÁNYAI, K.; TU, X.; JIANG, B. Simian Genogroup I Picobirnaviruses: Prevalence, Genetic Diversity and Zoonotic Potential. **Journal of Clinical Microbiology**, v.50, n.8, p.2779-2782, 2012.

WOO, P.C., LAU, S.K., BAI, R., TENG, J.L., LEE, P., MARTELLI, P., HUI, S.W., YUEN, K.Y. Complete genome sequence of a novel picobirnavirus, otarinepicobirnavirus, discovered in California sea lions. **Journal of Virology**, v.86, n.11, p. 6377– 6378, 2012.

APÊNDICE A: Soluções e Tampões

- **Hidratação da sílica**

- 60 g de sílica
- Adicionar 500 mL de água MilliQ autoclavada
- Agitar lentamente e manter em repouso durante 24 h
- Por sucção, desprezar 430 mL do sobrenadante
- Ressuspender a sílica em 500 mL de água bidestilada
- Manter em repouso durante 5 h para sedimentar
- Desprezar 440 mL do sobrenadante
- Adicionar 600 µL de HCl (32% w/v) para ajustar o pH (pH=2,0)
- Aliquotar e autoclavar

- **Solução L6**

- 120 g de tiocianato de guanidina (GUSCN)
- 100 mL de TRIS-HCl 0,1 M pH 6,4
- 22 mL de EDTA 0,2 M pH 8,0
- 2,6 g de Triton x 100

- **Solução L2**

- 120 g de tiocianato de guanidina (GUSCN)
- 100 mL de TRIS-HCl 0,1 M pH 6,4

- **Tampão de amostra para eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA)**

- 0,2 mL de azul de bromofenol 1%
- 6,0 mL de SDS 10%
- 1 mL de 2-mercaptoetanol
- 2,5 mL de TRIS-HCl 0,5 M

- **Tampão de corrida para EGPA**

- 30 g de TRIS (0,24 M)
- 14,4 g de ácido aminoacético (glicina) ($\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$) (0,19 M)
- Água bidestilada q.s.p. 1 litro

- **Tampão estabilizador de rotavírus (TRIS/Ca⁺⁺ 10 x)**
 - 12,12 g TRIS (10 mM)
 - 2,2 g cloreto de cálcio (1,5 mM)
 - Água MilliQ autoclavada q.s.p. 1 L
 - pH = 7,4
- **SDS 10%**
 - 5 g dodecilsulfato de sódio – Lauril sulfato de sódio – SDS (C₁₂H₂₅NaO₄S)
 - Água MilliQ autoclavada q.s.p. 50 mL
- **Fenol / clorofórmio – álcool isoamílico (25:24:1)**
 - 24 mL fenol saturado
 - 24 mL clorofórmio
 - 1 mL álcool isoamílico
- **Lower TRIS pH 8,8 para confecção do gel inferior da EGPA**
 - 36,34 g de TRIS (1,5 M)
 - Água bidestilada q.s.p. 200 mL
- **Upper TRIS pH 6,8 para confecção do gel superior da PAGE**
 - 12,12 g de TRIS (0,5 M)
 - Água bidestilada q.s.p. 200 mL
- **Solução Acrilamida / Bisacrilamida**
 - 1,3 g de bisacrilamida
 - 50 g de acrilamida
 - Água bidestilada q.s.p. 100 mL
- **Solução fixadora para EGPA**
 - 30 mL de álcool etílico absoluto
 - 1,5 mL de ácido acético
 - Água bidestilada q.s.p. 300 mL

- **Solução de nitrato de prata para EGPA**
 - 0,55 g de nitrato de prata
 - Água bidestilada q.s.p. 300 mL
- **Solução reveladora para EGPA**
 - 9 g de hidróxido de sódio
 - 2,5 mL de formaldeído
 - 0,06 g de borohidreto de sódio
 - Água bidestilada q.s.p. 300 mL
- **Solução *stop* da coloração para EGPA**
 - 15 mL de ácido acético P.A.
 - Água bidestilada q.s.p. 300 mL
- **Solução conservadora para EGPA**
 - 15 mL de álcool etílico P.A.
 - Água bidestilada q.s.p. 300 mL
- **Gel inferior (7,5%) ou gel de resolução da EGPA**
 - 5 mL de Lower TRIS
 - 3 mL de acrilamida/bisacrilamida
 - 50 µL de TEMED
 - 0,56 mL de persulfato de amônio 2%
 - 11,44 mL de água bidestilada
- **Gel superior (3,5%) ou gel de empilhamento da EGPA**
 - 2,5 mL de Upper TRIS
 - 1 mL de acrilamida/bisacrilamida
 - 100 µL de TEMED
 - 0,60 mL de persulfato de amônio 2%
 - 6,20 mL de água bidestilada

APÊNDICE B: Protocolo de Técnicas

- **Suspensão fecal – Extração bruta**
 - 1g do extrato fecal
 - 9 ml de tampão TRIS/Ca⁺⁺ 1x
(Para amostras muito líquidas estabelecer a proporção 1:2)
 - Homogeneizar
 - Centrifugar 10 min a 10.000 x g
 - Recolher sobrenadante
 - Identificar e estocar em frascos a 4° C

- **Extração do RNA: associação das técnicas fenol/clorofórmio – álcool isoamílico e sílica/ isotiocianato de guanidina**
 - 400 µL da suspensão fecal
 - 400 µL de fenol / clorofórmio – álcool isoamílico
 - Homogeneizar em vórtex
 - Banho-maria a 56° C durante 15 min.
 - Centrifugar a 10.000 x g durante 10 min.
 - Recolher sobrenadante em outro tubo
 - 30 µL de sílica hidratada
 - 900 µL de solução L6
 - Homogeneizar em vórtex
 - Agitar durante 30 min. à temperatura ambiente
 - Centrifugar a 10.000 x g durante 30 s.
 - Desprezar sobrenadante em solução contendo NaOH 10M
 - Adicionar 500 µL de solução L2
 - Homogeneizar em vórtex
 - Centrifugar a 10.000 x g durante 30 s.
 - Desprezar sobrenadante em solução contendo NaOH 10M
 - Adicionar 500 µL de solução L2
 - Homogeneizar em vórtex
 - Centrifugar a 10.000 x g durante 30 s.
 - Desprezar sobrenadante em solução contendo NaOH 10M

- Adicionar 1 mL de etanol a 70%
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar a 10.000 x g durante 30 s.
- Desprezar sobrenadante
- Adicionar 1 mL de etanol a 70%
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar a 10.000 x g durante 30 s.
- Desprezar sobrenadante
- Adicionar 1 mL de acetona PA
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar a 10.000 g durante 1 min.
- Desprezar sobrenadante
- Secar o *pellet* em banho-maria à 56° C durante 15 min. (tubo aberto)
- Adicionar 50 µL de água MilliQ autoclavada
- Homogeneizar em vórtex
- Banho-maria à 56° C durante 15 min. (tubo fechado)
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar a 10.000 x g durante 2 min.
- Recolher sobrenadante em eppendorf de 500 µL
- Estocar a -20°C

• **Montagem das placas de eletroforese e aplicação das amostras:**

- Placas de vidro, espaçadores e pente: lavar com água e sabão, secar e limpar com álcool.
- Montar as duas placas de vidro separadas pelos espaçadores inferiores e laterais.
- Fixar as placas com grampos
- Selar as extremidades com ágar 2%.
- Adicionar gel inferior (gel de resolução) e aguardar a polimerização
- Adicionar o gel superior (gel de empilhamento)
- Introduzir o pente para formação das canaletas
- Aguardar polimerização

- Após completa polimerização do gel, fixar cuidadosamente as placas à cuba de eletroforese.
 - Adicionar tampão de corrida nos reservatórios superior e inferior da cuba.
 - Retirar espaçador inferior e o pente
 - Adicionar amostras nas canaletas – amostras: aliquotar 15 µL de amostra de RNA + 3µL de tampão de amostra - em tubo tipo ependorff novo - banho-maria 56°C por 10 a 15 minutos.
 - Após adição de todas as amostras, ligar a fonte da eletroforese e ajustar a corrente (inicialmente manter em 60V a 20mA; aumentar a corrente para 100V após a migração das amostras para o gel inferior).
 - Aguardar a corrida eletroforética mediante visualização da migração do corante azul de bromofenol próximo ao limite inferior do gel de poliacrilamida
-
- **Coloração do gel de poliacrilamida**
 - Após a eletroforese, transferir o gel em um recipiente e submergir em solução fixadora por 30 minutos (o gel pode permanecer por mais tempo nesta solução)
 - Desprezar solução fixadora
 - Adicionar a solução contendo o corante nitrato de prata. Deixar o gel por 30 minutos nesta solução, sob agitações periódicas
 - Desprezar a solução corante; lavar o gel 2 vezes com água destilada
 - Adicionar a solução reveladora
 - Manter o gel na solução reveladora até visualização das bandas
 - Após visualização das bandas, interromper a revelação pela adição da solução STOP por 15 minutos, no mínimo
 - Manter o gel em solução conservadora até a secagem e/ou fotodocumentação

APÊNDICE C: Matriz de identidade

CÓDIGO DE ACESSO	bovine_PBV18	HM803965	KC865829	KC865826	KC865807	KC865804	KC846792	KC846797	KC846783	AB517732	AB517736	AB517739	GQ915029	GQ221268	JX310440	JX310441
bovine_PBV18	ID	0,809	0,753	0,753	0,723	0,723	0,738	0,738	0,733	0,733	0,723	0,728	0,723	0,623	0,708	0,658
HM803965	0,809	ID	0,673	0,673	0,693	0,693	0,683	0,673	0,678	0,673	0,663	0,688	0,698	0,603	0,638	0,663
KC865829	0,753	0,673	ID	1	0,713	0,713	0,718	0,748	0,778	0,713	0,713	0,728	0,753	0,562	0,728	0,653
KC865826	0,753	0,673	1	ID	0,713	0,713	0,718	0,748	0,778	0,713	0,713	0,728	0,753	0,562	0,728	0,653
KC865807	0,723	0,693	0,713	0,713	ID	0,989	0,763	0,693	0,693	0,713	0,693	0,793	0,773	0,663	0,683	0,663
KC865804	0,723	0,693	0,713	0,713	0,989	ID	0,763	0,683	0,688	0,708	0,688	0,793	0,773	0,663	0,683	0,663
KC846792	0,738	0,683	0,718	0,718	0,763	0,763	ID	0,708	0,698	0,668	0,688	0,728	0,718	0,643	0,653	0,708
KC846797	0,738	0,673	0,748	0,748	0,693	0,683	0,708	ID	0,708	0,809	0,763	0,758	0,743	0,623	0,713	0,663
KC846783	0,733	0,678	0,778	0,778	0,693	0,688	0,698	0,708	ID	0,723	0,708	0,663	0,698	0,633	0,678	0,638
AB517732	0,733	0,673	0,713	0,713	0,713	0,708	0,668	0,809	0,723	ID	0,793	0,788	0,753	0,638	0,693	0,638
AB517736	0,723	0,663	0,713	0,713	0,693	0,688	0,688	0,763	0,708	0,793	ID	0,733	0,738	0,663	0,708	0,663
AB517739	0,728	0,688	0,728	0,728	0,793	0,793	0,728	0,758	0,663	0,788	0,733	ID	0,874	0,648	0,668	0,693
GQ915029	0,723	0,698	0,753	0,753	0,773	0,773	0,718	0,743	0,698	0,753	0,738	0,874	ID	0,633	0,708	0,708
GQ221268	0,623	0,603	0,562	0,562	0,663	0,663	0,643	0,623	0,633	0,638	0,663	0,648	0,633	ID	0,603	0,557
JX310440	0,708	0,638	0,728	0,728	0,683	0,683	0,653	0,713	0,678	0,693	0,708	0,668	0,708	0,603	ID	0,678
JX310441	0,658	0,663	0,653	0,653	0,663	0,663	0,708	0,663	0,638	0,638	0,663	0,693	0,708	0,557	0,678	ID

Legenda:

bovine_PBV18_UFPR_Palotina

HM803965: Picobirnavirus turkey MD-2010

KC865829: Avian picobirnavirus PBV GI chicken BRA AVE_108_2011 clone 1

KC865826: Avian picobirnavirus PBV GI chicken BRA AVE 104-2010 clone 3

KC865807: Avian picobirnavirus GI strain PBV GI chicken BRA AVE_61_2009 clone 1

KC865804: Avian picobirnavirus PBV GI chicken BRA AVE_57_2009 clone 1

KC846792: Porcine picobirnavirus CHHN-B13
KC846797: Porcine picobirnavirus CHHN-B18
KC846783: Porcine picobirnavirus CHHN-B4
AB517732: Human picobirnavirus GPBV6C2
AB517736: Human picobirnavirus GPBV10
AB517739: Human picobirnavirus GPBV12
GQ915029: Human picobirnavirus strain Pak-HPBV-2
GQ221268: Picobirnavirus bovine RUBV-P IND 2005
JX310440: Picobirnavirus GI PBV Bovine India PTN 2009 P2
JX310441: Picobirnavirus GI PBV Bovine India PTN 2011 P120

APÊNDICE D: Relação das fezes avaliadas no período de estudo e os resultados obtidos

Número da amostra	Idade	Sexo	Característica fezes	Resultado EGPA		RT-PCR PBV	Resultado <i>Cryptosporidium spp.</i>
				Picobirnavírus			
				Curto	Longo		
RV 21	1 mês	F	Diarréica	+	-	+	-
RV 22	1 mês	M	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 51	10 dias	M	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 52	10 dias	F	Não diarréica	-	-	NR	NR
RV 53	15 dias	F	Não diarréica	-	+	-	-
RV 54	4 meses	F	Não diarréica	-	-	NR	NR
RV 55	10 dias	F	Não diarréica	-	-	NR	NR
RV 71	NI	F	Não diarréica	-	-	NR	NR
RV 72	NI	F	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 73	NI	F	Não diarréica	-	-	NR	NR
RV 74	NI	F	Não diarréica	-	-	NR	NR
RV 75	NI	F	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 76	NI	F	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 77	NI	F	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 78	NI	F	Não diarréica	-	-	NR	NR
RV 79	NI	F	Não diarréica	-	-	NR	NR
RV 80	NI	F	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 81	NI	F	Não diarréica	-	-	NR	NR
RV 82	NI	F	Diarréica	+	-	+	+
RV 83	NI	F	Diarréica	+	-	+	-
RV 84	45 dias	F	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 85	1 mês	F	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 86	10 dias	F	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 87	15 dias	F	Diarréica	-	-	NR	NR

RV 88	12 dias	F	Diarréica	+	-	-	+
RV 89	10 dias	F	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 94	7 dias	F	Não diarréica	-	-	NR	NR
RV 95	< 30 dias	F	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 96	< 30 dias	F	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 97	< 30 dias	F	Não diarréica	-	-	NR	NR
RV 98	< 30 dias	F	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 99	< 30 dias	F	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 100	< 30 dias	F	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 101	< 30 dias	F	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 102	< 30 dias	F	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 103	< 30 dias	F	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 104	< 30 dias	F	Diarréica	+	-	+	+
RV 105	< 30 dias	F	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 106	< 30 dias	F	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 107	< 30 dias	F	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 108	< 30 dias	F	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 109	< 30 dias	F	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 110	< 30 dias	F	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 111	< 30 dias	F	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 112	< 30 dias	F	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 113	< 30 dias	F	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 114	< 30 dias	F	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 115	< 30 dias	F	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 116	< 30 dias	F	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 117	< 30 dias	F	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 118	< 30 dias	F	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 119	< 30 dias	F	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 120	< 30 dias	F	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 121	< 30 dias	F	Diarréica	-	-	NR	NR

RV 122	< 30 dias	F	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 123	< 30 dias	F	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 124	40 dias	F	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 125	50 dias	F	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 126	40 dias	M	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 127	60 dias	M	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 128	35 dias	F	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 129	18 dias	F	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 130	35 dias	F	Não diarréica	-	-	NR	NR
RV 131	NI	F	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 132	90 dias	M	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 133	33 dias	F	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 134	20 dias	F	Diarréica	+	-	+	+
RV 135	8 dias	F	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 136	12 dias	F	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 137	10 dias	F	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 138	30 dias	F	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 139	12 dias	F	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 140	7 dias	F	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 141	15 dias	F	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 142	7 dias	F	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 176	7 dias	F	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 177	10 dias	F	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 178	8 dias	F	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 179	4 dias	F	Não diarréica	-	-	NR	NR
RV 180	7 dias	F	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 181	4 dias	F	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 182	7 dias	F	Não diarréica	-	-	NR	NR
RV 183	14 dias	F	Não diarréica	-	-	NR	NR
RV 184	15 dias	M	Diarréica	-	-	NR	NR

RV 185	10 dias	F	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 186	7 dias	F	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 187	12 dias	F	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 188	15 dias	F	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 189	6 dias	F	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 190	20 dias	F	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 191	20 dias	M	Não diarréica	-	-	NR	NR
RV 192	10 dias	F	Não diarréica	-	-	NR	NR
RV 195	28 dias	F	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 196	28 dias	F	Não diarréica	-	-	NR	NR
RV 197	21 dias	F	Não diarréica	-	-	NR	NR
RV 198	21 dias	F	Não diarréica	-	-	NR	NR
RV 199	7 dias	F	Não diarréica	-	-	NR	NR
RV 200	14 dias	F	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 201	28 dias	F	Não diarréica	-	-	NR	NR
RV 202	7 dias	F	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 203	14 dias	F	Não diarréica	-	-	NR	NR
RV 204	21 dias	F	Não diarréica	-	-	NR	NR
RV 205	28 dias	F	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 206	7 dias	F	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 207	21 dias	F	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 208	7 dias	F	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 209	21 dias	F	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 210	21 dias	F	Diarréica	-	+	-	-
RV 211	7 dias	F	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 212	NI	F	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 213	24 dias	F	Não diarréica	-	-	NR	NR
RV 214	40 dias	F	Não diarréica	-	-	NR	NR
RV 215	28 dias	F	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 216	14 dias	F	Não diarréica	-	-	NR	NR

RV 217	7 dias	F	Não diarréica	-	-	NR	NR
RV 218	28 dias	F	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 219	21 dias	F	Não diarréica	-	-	NR	NR
RV 220	7 dias	F	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 221	7 dias	F	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 222	7 dias	F	Não diarréica	-	-	NR	NR
RV 223	21 dias	F	Não diarréica	-	-	NR	NR
RV 224	7 dias	F	Não diarréica	-	-	NR	NR
RV 225	21 dias	F	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 226	14 dias	F	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 227	14 dias	F	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 228	7 dias	F	Não diarréica	-	-	NR	NR
RV 229	14 dias	F	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 230	7 dias	F	Não diarréica	-	-	NR	NR
RV 231	14 dias	F	Não diarréica	-	-	NR	NR
RV 232	4 dias	F	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 233	40 dias	F	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 234	14 dias	F	Não diarréica	-	-	NR	NR
RV 235	7 dias	F	Diarréica	+	-	-	-
RV 236	7 dias	F	Não diarréica	-	-	NR	NR
RV 237	14 dias	F	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 240	7 dias	F	Não diarréica	-	-	NR	NR
RV 241	21 dias	F	Não diarréica	-	-	NR	NR
RV 242	14 dias	F	Não diarréica	-	-	NR	NR
RV 243	21 dias	F	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 244	14 dias	F	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 245	21 dias	F	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 246	7 dias	F	Não diarréica	-	-	NR	NR
RV 247	14 dias	F	Não diarréica	-	-	NR	NR
RV 248	7 dias	F	Diarréica	-	-	NR	NR

RV 249	7 dias	F	Não diarreica	-	-	NR	NR
RV 250	21 dias	F	Diarreica	+	-	+	-
RV 251	28 dias	F	Não diarreica	-	-	NR	NR
RV 252	7 dias	F	Diarreica	-	-	NR	NR
RV 253	21 dias	F	Não diarreica	-	-	NR	NR
RV 254	7 dias	F	Diarreica	-	-	NR	NR
RV 255	28 dias	F	Diarreica	-	-	NR	NR
RV 256	7 dias	F	Diarreica	-	-	NR	NR
RV 257	7 dias	F	Não diarreica	-	-	NR	NR
RV 258	14 dias	F	Não diarreica	-	-	NR	NR
RV 259	7 dias	F	Não diarreica	-	-	NR	NR
RV 260	14 dias	F	Não diarreica	-	-	NR	NR
RV 261	21 dias	F	Diarreica	-	-	NR	NR
RV 262	21 dias	F	Diarreica	-	-	NR	NR
RV 263	14 dias	F	Diarreica	-	-	NR	NR
RV 264	14 dias	F	Diarreica	-	-	NR	NR
RV 265	7 dias	F	Diarreica	-	-	NR	NR
RV 420	14 dias	F	Diarreica	-	-	NR	NR
RV 421	21 dias	F	Não diarreica	-	-	NR	NR
RV 422	21 dias	F	Não diarreica	-	-	NR	NR
RV 423	7 dias	F	Não diarreica	-	-	NR	NR
RV 424	14 dias	F	Não diarreica	-	-	NR	NR
RV 425	NI	F	Diarreica	+	-	+	-
RV 426	14 dias	F	Não diarreica	-	-	NR	NR
RV 427	14 dias	F	Não diarreica	-	-	NR	NR
RV 428	NI	F	Diarreica	-	-	NR	NR
RV 429	NI	F	Não diarreica	-	-	NR	NR
RV 430	NI	F	Diarreica	-	-	NR	NR
RV 431	NI	F	Diarreica	-	-	NR	NR
RV 432	NI	F	Diarreica	-	-	NR	NR

RV 433	14 dias	F	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 434	NI	F	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 435	7 dias	F	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 436	14 dias	F	Não diarréica	-	-	NR	NR
RV 437	7 dias	F	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 438	14 dias	F	Não diarréica	-	-	NR	NR
RV 439	21 dias	F	Não diarréica	-	-	NR	NR
RV 440	7 dias	F	Não diarréica	-	-	NR	NR
RV 441	7 dias	F	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 442	14 dias	F	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 443	7 dias	F	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 444	14 dias	F	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 445	7 dias	F	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 446	14 dias	F	Diarréica	-	-	NR	NR
RV 447	21 dias	F	Não diarréica	+	-	+	-
RV 448	7 dias	F	Diarréica	-	-	NR	NR
UPBN 04	NI	F	Diarréica	+	-	-	+
UPBN 05	NI	F	Diarréica	-	-	NR	NR
UPBN 35	NI	F	Diarréica	-	-	NR	NR
UPBN 36	NI	F	Diarréica	-	-	NR	NR
UPBN 37	NI	F	Não diarréica	-	-	NR	NR
UPBN 38	NI	F	Não diarréica	+	-	+	-
UPBN 39	NI	F	Não diarréica	+	-	+	-
UPBN 40	NI	F	Diarréica	-	-	NR	NR
UPBN 41	NI	F	Não diarréica	-	-	NR	NR
UPBN 42	NI	F	Não diarréica	-	-	NR	NR
UPBN 43	NI	F	Não diarréica	-	-	NR	NR
UPBN 44	NI	F	Não diarréica	-	-	NR	NR
UPBN 45	NI	F	Diarréica	-	-	NR	NR
UPBN 46	NI	F	Diarréica	-	+	-	-

UPBN 47	NI	F	Não diarreica	-	-	NR	NR
UPBN 48	NI	F	Não diarreica	-	-	NR	NR
UPBN 49	NI	F	Não diarreica	+	-	-	+
UPBN 50	NI	F	Diarreica	-	-	NR	NR
UPBN 51	NI	F	Diarreica	-	-	NR	NR
UPBN 52	NI	F	Diarreica	-	-	NR	NR
UPBN 53	NI	F	Não diarreica	-	-	NR	NR
UPBN 54	NI	F	Não diarreica	-	-	NR	NR
UPBN 55	NI	F	Diarreica	-	-	NR	NR
UPBN 56	NI	F	Diarreica	-	-	NR	NR
UPBN 73	NI	F	Não diarreica	-	-	NR	NR
UPBN 74	NI	F	Diarreica	-	-	NR	NR
UPBN 75	NI	F	Diarreica	-	-	NR	NR
UPBN 76	NI	F	Diarreica	-	-	NR	NR
UPBN 77	NI	F	Diarreica	-	-	NR	NR
UPBN 78	NI	F	Diarreica	-	-	NR	NR
UPBN 79	NI	F	Diarreica	-	-	NR	NR
UPBN 80	NI	F	Diarreica	-	-	NR	NR
UPBN 99	NI	F	Diarreica	+	-	+	-
UPBN 100	NI	F	Não diarreica	-	-	NR	NR
UPBN 101	NI	F	Diarreica	-	-	NR	NR
UPBN 102	NI	F	Não diarreica	-	-	NR	NR
UPBN 103	NI	F	Diarreica	-	-	NR	NR
UPBN 104	NI	F	Não diarreica	-	-	NR	NR
UPBN 105	NI	F	Diarreica	-	-	NR	NR
UPBN 106	NI	F	Não diarreica	-	-	NR	NR
UPBN 107	NI	F	Não diarreica	-	-	NR	NR
UPBN 108	NI	F	Não diarreica	-	-	NR	NR
UPBN 109	NI	F	Não diarreica	-	-	NR	NR
UPBN 110	NI	F	Não diarreica	-	-	NR	NR

UPBN 111	NI	F	Não diarreica	-	-	NR	NR
UPBN 112	NI	F	Não diarreica	-	-	NR	NR
UPBN 113	NI	F	Não diarreica	+	-	+	-
UPBN 114	NI	F	Não diarreica	-	-	NR	NR
UPBN 115	NI	F	Não diarreica	-	-	NR	NR
UPBN 116	NI	F	Diarreica	-	-	NR	NR
UPBN 117	NI	F	Não diarreica	-	-	NR	NR
UPBN 118	NI	F	Não diarreica	-	-	NR	NR
UPBN 119	NI	F	Diarreica	-	-	NR	NR
UPBN 120	NI	F	Diarreica	-	-	NR	NR
UPBN 121	NI	F	Não diarreica	-	-	NR	NR
UPBN 122	NI	F	Não diarreica	-	-	NR	NR
UPBN 123	NI	F	Diarreica	+	-	+	+
UPBN 124	NI	F	Diarreica	-	-	NR	NR
UPBN 125	NI	F	Diarreica	+	-	+	-
UPBN 126	NI	F	Não diarreica	-	-	NR	NR
UPBN 127	NI	F	Não diarreica	-	-	NR	NR
UPBN 131	NI	F	Diarreica	-	-	NR	NR
UPBN 132	NI	F	Não diarreica	-	-	NR	NR
UPBN 133	NI	F	Não diarreica	-	-	NR	NR
UPBN 134	NI	F	Não diarreica	-	-	NR	NR
UPBN 135	NI	F	Não diarreica	-	-	NR	NR
UPBN 136	NI	F	Não diarreica	-	-	NR	NR
UPBN 137	NI	F	Não diarreica	-	-	NR	NR
UPBN 138	NI	F	Não diarreica	-	-	NR	NR
UPBN 139	NI	F	Não diarreica	-	-	NR	NR
UPBN 140	NI	F	Não diarreica	-	-	NR	NR
UPBN 141	NI	F	Diarreica	-	-	NR	NR
UPBN 142	NI	F	Diarreica	-	-	NR	NR
UPBN 143	NI	F	Diarreica	-	-	NR	NR

UPBN 144	NI	F	Diarréica	-	-	NR	NR
UPBN 145	NI	F	Não diarréica	-	-	NR	NR
UPBN 146	NI	F	Diarréica	-	-	NR	NR
UPBN 147	NI	F	Não diarréica	-	-	NR	NR
UPBN 148	NI	F	Diarréica	-	-	NR	NR
UPBN 149	NI	F	Diarréica	-	-	NR	NR
UPBN 150	NI	F	Não diarréica	-	-	NR	NR
UPBN 151	NI	F	Não diarréica	-	-	NR	NR
UPBN 152	NI	F	Diarréica	-	+	-	-
UPBN 153	NI	F	Diarréica	-	+	-	-
UPBN 154	NI	F	Não diarréica	-	-	NR	NR
UPBN 155	NI	F	Diarréica	-	-	NR	NR
UPBN 156	NI	F	Diarréica	-	-	NR	NR
UPBN 157	NI	F	Diarréica	-	-	NR	NR
UPBN 158	NI	F	Diarréica	-	-	NR	NR
UPBN 159	NI	F	Diarréica	-	-	NR	NR
UPBN 160	NI	F	Não diarréica	-	-	NR	NR
UPBN 161	NI	F	Não diarréica	-	-	NR	NR
UPBN 162	NI	F	Diarréica	+	-	+	-
UPBN 163	NI	F	Diarréica	-	-	NR	NR
UPBN 164	NI	F	Diarréica	-	-	NR	NR
UPBN 165	NI	F	Diarréica	-	-	NR	NR
UPBN 166	NI	F	Não diarréica	-	-	NR	NR
UPBN 167	NI	F	Não diarréica	-	-	NR	NR
UPBN 168	NI	F	Não diarréica	-	-	NR	NR

NI: Não informado

NR: Não realizado